9日本国特許庁(JP)

10 特許出願公表

⑩公表特許公報(A)

平1-503438

码公表 平成1年(1989)11月22日

⑤Int. Cl. ⁴ C 12 N

識別記号 ZNA

庁内蛮理番号 -8717-4B

審 査 請 求 未請求 予備吞査請求 未請求

部門(区分) 1(1)

15/00 39/395 A 61 K 7/06

8829-4C Z-8318-4H ×

(全 37 頁)

❷発明の名称

ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ポリペプチド及び抗体

到特 顧 昭63-503555

6000出 顧 昭63(1988) 3月29日 60部訳文提出日 昭63(1988)11月30日

89国際出願 PCT/US88/00998

创国際公開番号 WO88/07543

動国際公開日 昭63(1988)10月6日

優先権主張

図1987年3月31日図米国(US) 図033,047

@発 明 老 アメリカ合衆国 カリフオルニア州 92037 ラ ジョラ アヴェ

ニド ド ラ プラヤ 2362

願 人 മ്പ

スクリツプス クリニック ア ンド リサーテ フアウンデー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ノース

トーリー パインス ロード 10666

ション

エツジングトン

20代 理 人 弁理士 中村

稔 外8名

卵指 定 国

AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB

(広域特許), 1 T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), N O, S E (広域特許)

最終頁に続く

浄春(内容に変更なし) 難求の疑題

- (1) ヒトの組織因子意鎮タンパク電をコードする構造遺伝子を駆 食する配列を含む、わずか約12.000ヌクレオチド塩基対を 含むDNA断片。
- (2) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残器で 変わされるアミノ放送益比列を有するタンパク質をコードする、 防水の短期(1) 記数のDNA断片。
- (3) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130巻から約918巻の 塩基で衰わされるヌクレオチド塩基配列を有する、鎌水の範囲 (2) 紀載のDNA断片。
- (4) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約219番の残益で 表わされるアミノ酸残差配列を有する可溶性とト組織因子重鎮 タンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (5) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約786番の 塩基で扱わされるヌクレオチド塩基配列を有する、精球の範囲 (4) 記載のDNA断片。
- (6) 上記第1の配列の5 * 末端に連続し、かつ上記タンパク質の アミノ末端に結合した、アミノ酸残益リーダ配列をコードする 第2の配列も合み、かつ該第1及び第2のDNA配列がヒト組 路房子童信前監体タンパク室をコードする提成構造遺伝子を定 森する、緯式の範囲(I)記載のDNA断片。
- (7) 上記報应措造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残 益で表わされるアミノ政務器配列を有するタンパク質をコード する、技术の範囲(6)記載のDNA断片。
- (8) 上記復成構造遺伝子が、第2図の約34巻から約918巻の 塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (7) 記載のDNA断片。

- (9) 上記湿成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約219番 の残器で表わされるアミノ位殊器配列を対する。可溶性ヒト組 旋因子登録タンパク質前額体をコードする、請求の範囲(6)記 載のDNA断片。
- (10)上記提成構造遺伝子が、第2図の約34番から約786番の 塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (9) 記載のDNA斯片。
- (11)ヒト組織因子重領タンパク質をコードする精造遺伝子を定義 する第1のDNA所片に根能的に結合したベクターを含む組換 えDNA分子。
- (12)上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残器で 考わされるアミノ的研茶配剤を有するタンパク電をコードする。 請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (13)上記構造遺伝子が、第2図の約130番から約918番の塩 益で表わされるヌクレオチド塩益紀列を有する、請求の範囲 (11) 記載の組換えDNA分子。
- (14)さらに、上記第1の断片の5、宋緒に連続し、かつ上記タン パク質に結合した、アミノ酸残益リーダー配列をコードし、か つ該第1及び第2のDNA断片が、上記タンパク質の前駆体を コードする混成機造遺伝子を定義する、請求の範囲(11)配数の 组构式DNA分子。
- (15)上記混成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約263番 の残茎で表わされるアミノ散残蓄紀列に対応するアミノ酸残益 紀列を有する、上記タンパク質の前駆体をコードする、請求の 範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (16) ト記録成構造遺伝子が、第2図の約34巻から約918巻の 塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列に対応するヌクレオチ

F塩基配列を存する、請求の範囲(15)記載の組換えDNA分子。

- (17)上記ペクターが上記第1及び第2のDNA断片の復製を指揮しうる、接求の延囲(11)記載の超換えDNA分子。
- (18)上記ベクターが、宿主研節中、上記タンパク質を発現しうる、 静水の範囲([1])記載の組換えDNA分子。
- (19)上記ベクターが、宿主知節中、上記前駆体タンパク質を発現 しうる、緯次の範囲(14)記載の銀換えDNA分子。
- (20)上記ベクターが、p K S V 1 O であり、かつ、上記還成構造遺伝子が、可容型の上記前駆体タンパク質をコードし、かつ、 第2回の34番から786番の塩器で表わされるスクレオチド 野効を有する、除途の範疇(19)記載の組換え D N A 分子。
- (21)わずか約50アミノ放残器を含み、かつ、

- VNGVYTVGIST -.

- FAAMK2222EKKI -

からなる群から選ばれた式で乗わされる配列に対応するアミノ 酸残器を含む、ヒト級機因子結合部位ペプチド親収物。

(22)上記ポリペプチドが、式:

R - VNOVYTVOIST - ON

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(23) 上記ポリペプチドが、式:

B - LYYWXSSSSEKKT - OH

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(24)

からなる最から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位 ポリペプチド類似物。

- (28)上記抗体か、生理学的に許容しうる希釈剤中に存在する、請求の範囲(26)記載の抗体組成物。
- (29) ヒト超機因子重収タンパク質及び第1回の26番から49番の残器で示される式で扱わされるポリペプチドと免疫反応する 統件分子を度生する、TP8-5G9と命名されたハイブリドーマ。
- (30)請求の範囲(29)記載のハイブリドーマにより産生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (31) ヒト組織因子重領タンパク質及び、第1回の第26番から第 69番の残骸で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を度生する、TF9-10H10と命名された、 ハイブリドーマ。
- (32) 請求の範囲(31) 記載のハイプリドーマにより度生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (33) ヒト組織因子重額及び、第1図の第146番から第167番で示される式で変わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TP9-6B4と命名した、ハイブリドーマ。
- (34) 請求の範囲(33) 記数のハイブリドーマにより遺生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (35)a)身体サンブルを、ヒト組織因子重領タンパク質と混合し、 免疫反応混合物を作る;
 - b)この混合物を、上記抗体がサンプル中に存在するヒト組織 因子と免疫反応し、免疫反応産物を形成するのに十分な時 間維持する、そして、

c)ステップb) で生成した免疫反応産物の存在を検定する、 以上、a) - c) のステップを含む、体液サンブル中のヒト組 機因子素質タンパク質の存在を検定する方法。 (25)

からなる群から選ばれた式で表わされるとト組織因子結合部位 ポリペプチド類似物。

- (26)ョ)ヒト組織因子章鎮タンパク質と免疫反応し、
 - b)

からなる評から選ばれた式で変わされるポリペプチドと免 疫反応し、かつ

- c) 第1図の第204番から第226番の部位で示される式 で表わされるポリペプチドと実質的に免疫反応しない、 抗体分子を含む、抗体組成物。
- (27)上記抗体がラベルに結合している、請求の範囲(26)記載の組 成物。
- (36) a) 生理学的に許容しうる希釈利及び、血性中に存在するヒト 観機因子と効率よく免疫反応する、生体内指示手段と結合 した、ハイブリドーマTF9-10810によって産生される、ある量の抗体分子を合むモノクローナル抗体観成物 を被検者に詐欺役与する:
 - b)上記投与を受けた被検者を、上記抗体分子が、血栓の一部 として生体内に存在する超微因子と免疫反応し、免疫反応 度物を形成するのに十分な、予め次められた時間維持する;

c)ステップb) で生成した免疫反応重物の存在を検定する、 以上、a) ~ c) のステップを含む生体内の血栓を検出する方 法。

- (87) 存在するとト組織因子と効率よく結合する、TF8-5G9 及びTF9-6B4からなる群から選らんだハイブリドーマに よって度生される、ある量の抗体分子を含有する生理学的に許 容される特釈剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被検体 に詐欺役与することを含む、生体内におけるとト組織因子の凝 血因子VI/VI=への結合能を中和する方法。
- (38)組成物中、因子リンリョと効率的に結合する量の、

からなる群から選ばれたポリペプチドを、含有する生理学的に 許容された特別形を含むポリペプチド組成物を被検者に静原投 与することを含む、生体内におけるヒト組織因子の凝血因子 V/II a への結合を風害する方法。

(39) a) 請求の範囲(22)記載の抗体組成物を含有するパッケージ

を含むサンプル中に存在すると)組織因子質額タンパク質の存在を検定するための、キットの形をした診断システム。

- (40)上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体組成物が、
 - a) TF8-5G9.
 - b) TF9-6B4.
 - c) TF9-10H10

からなる耳から選ばれたハイブリドーマにより産生される、請 求の範囲(39) 記載の診断システム。

- (41) a) サンプルを、固体マトリックスに固定した、諸求の範囲 (15) 記載のポリペプチドを含む固体サポートと混合しい結 合反応混合物とする、
 - b)上記結合反応混合物を、上記凝血因子が上記ポリペプチ ドと結合し、固相複合体及び上滑を形成するのに十分な時間維持する。
 - c) 上記復合体から上記上清を分離する、及び
 - 4) ステップ c) の分離した複合体から、上記凝血因子を回 ・ 収する。

以上、a) ~d) のステップを含む、サンプルから血液凝固因 子切/Viaを単鱗する方法。

- (42)実質的に、ヒト組織因子軽度タンパク質を含まない生理学的 活性のあるヒト組織因子重複タンパク質の水溶液を含む組成物。
- (43)上記生物学的活性のあるヒト組織因子重額タンパク質を、リン庭質中に分散させた、請求の範囲(42)記載の組成物。
- (44)上記移版が、非イオン性界面活性剤を含む、請求の範囲(42) 記載の組成物。
- (45)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1番から 第219番の部位で表わされるアミノ放残差配列を有する、請
- (50)上記波成構造遺伝子が、第2図の第34番から第786番の 塩基で表わされるヌクレオチド塩洗配列を有する、請求の範囲 (49)記載の方法。
- (51) 請求の範囲(49)記載の方法により産生した、成熟ヒト組織因 子童領タンパク質を基本的に合む組成物。
- (52) 請求の範囲(50) 記載の方法により産生した成熟ヒト組機因子 賃賃タンパク質を基本的に含む組成物。
- (53)ハイブリドーマTFB-5G9により座生される抗体分子を、 投与時間内に存在するヒト組織因子と効率よく結合できる量合 有する、生理学的に許容された希釈剤を含む、モノクローナル 抗体組成物を、被検者に静脈投与することを含む、ヒト組織因 子の、凝血開始能を中和する方法。
- (54) ヒト組織因子重領タンパク質及び、第1回の第26号から第 49号の残器で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を度生する、TF9-5B7と命名されたハイブリドーマ。
- (55)請求の範囲(54)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (56)ハイブリドーマTF9-5B7により産生される抗体分子を 合有する生理学的に許容された希釈形を含む治療に効果的な量 のモノクローナル抗体組成物を、被検者に投与することを含む、 ヒト組織因子の凝血開始能を中和する方法。
- (57) a) ヒト組織因子重額タンパク質と免疫反応し、それにより、 該タンパク質の因子MI/Miaへの結合能を阻害し、かつ
 - b) hu TF h: 13 / 13 a 複合体と免疫反応し、それにより、 接複合体の因子 X 活性化能を図客する抗体分子を含む治療 的に効果的量の、抗凝血モノクローナル抗体組成物を投与

求の範囲(42)記載の組成物。

(45)a)少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒト組織因子経費タンパク質を含まない、生物学的語性のあるヒト組織因子重要タンパク質の水溶液を含有する組成物を含むパッケージ。

を含む血管システム液体サンプル中での凝固的を検定するキッ トの形をした診断システム。

- (47)上記意質タンパク質がリン腹質中に分散している、諸求の延 囲(46)記載の体質システム。
- (48)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1番から 第219番の部位で表わされるアミノ放残器配列を有する、請 求の範囲(46)記載の診断システム。
- (49) a) とト組織因子重領タンパク賞をコードする構造遺伝子を定 鞭する第1のDNA断片及び、第1のDNA断片と連続し ており、かつ上記タンパク賞に結合する、アミノ設務器リーダー配列をコードする第2のDNA断片で、数第1及び 第2のDNA断片合せて上記タンパク質の前額体をコード する混成構造遺伝子を定しているDNA断片と確認的に結 合する、ホ乳質細胞に適合する発現ベクターを含む組織え DNA分子でトランスホームしたホ乳質細胞の栄養培地で の符巻を開始する:
 - b)上記培養物を上記細胞が上記組換えDNA分子由来のタンパク質を発現し、かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する、そして
- c)上記培養物から、上記成熟タンパク質を回収する、 以上、s) ~ c) のステップを含む、放熟とト組織因子重額タンパク質の調製方法。

することを含む豪血を駆害する方法。

(58)上記抗体分子がさらに、ヒヒ組織因子と免疫反応を起こすことを特徴とする、環境の範囲(57)記載の方法。

伊奇(内容に変更なし) 明 相 書

ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ ポリペプチド及び抗体

(本出願の関連文献)

本出版は、1987年3月31日に出頭された米国出頭第033,047号及び1987年6月25日に出資された出図第067,108号の部分総統出頭である。

(技術分野)

本発明は、ヒトの組織因子重旗タンパク質(huTFh)をコードする構造建位子を有する組織え DNA分子(rDNA)に関し、より詳細には、本発明は、宿主問題中に含まれる、huJFhを発現しつる発現ペクターに関するものである。また、本発明はhuTPhの合成ポリペプチド類似物及びhuTFh及びはポリペプチド類似物と結合するモノクローナル抗体に関する。

(発明の背景)

磁血は、一耳の凝集因子として知られる細胞性及び血躁性タンパク質によって仲介される、一選の、酵素、共因子、タンパク質分解及びゲル化反応のカスケードによって起こる。このカスケードの開始は、組織因子(TP)として知られる細胞性レセプターが、凝集因子以又はその誘導体、因子可。と結合し、触媒的に活性のある複合体を形成したときに起こる。TFの非存在下、及び複合体への連続する結合がない場合には、リグ可。は凝集を開始しない。従って、TPの化学的かつ生化学的特性が、凝集のメカニズムを理解する上で重要なことは明白である。

組織因子は、通常循環器中で可線化しておらず、また、因子W ノゼェ及び他の凝集因子を含む血酸タンパク質と接触できないこ とが分っている、確に結合した練タンパク質である。組織因子は

混合物の界面活性利及びイオン組成に影響されると報告されている。ネマーソン(Nemeraon), ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション(J. Clin. lavest.) 4 7~7 2頁(1968); ネマーソン(Nemerson), ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション(J. Clin. lavest.) 48~3 2 2頁(1969 年); 及びカーソン(Carson)等、サイエンス(Science)、208巻、307頁(1980年) 参照。

単離した、もしくは、再覧安化したTF合有タンパク質調整物は、数々の種の組織から協出物によって調要した。組織因子は、 天然の組織中に非常に少量しか存在しないので、歴史的に使用されてきた方法は、困難で、時間もかかり、かつ低収率であった。 古典的方法のレヴューとしては、ネマーソン(Nemerson) 等の報告(プログレス・イン・ヘマトシス・アンド・トロンポシス (Pros. Bem. Throm.) 6巻、237~261頁(1982年) を参照せよ。

最近、プローズ(Brose)等(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Blol. Ches.)260巻、10917~20(1985年)) ボム(Bose)等(トロンボ・リサーチ(Throsb. Ras.)42巻、635~643頁(1986年)及びグハ(Guha)等(プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Hatl. Acad. Sci.)USA83巻、299~302頁(1986年))は、設路質化組織因子タンパク質を、非イオン性界面活性利及びCoCececeを含む水溶性溶液に溶かした時、該タンパク質が因子リノVIaと結合するという発見に基づいた方法を用いて、ヒトの組織因子(butF)タンパク質を早期したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を早期したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を早期したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を早期したことを報告している。しかし、記述因子タンパク質を早期したことを報告している。しかし、記述因子タンパク質を早期したことを報告して、因子VI/VI製和性吸著体を用いる。これ

通常、血管を形成している研磨の表面上には発現されていないが、血管中の単球によるその発現は、バクテリアのリポ多様のような感染は試解成分、ある抗原により刺激されたTヘルペー細胞から誘導され、直接的にはある刺激されたTヘルペー細胞由来のリンホカイン及び免疫複合体によって誘導することができる。例えばバクテリアのリポ多様同様、インターロイキン1及び護路増死因子アルファのような単細胞/マクロファージのある炎症仲介物は血球の体液例表面にTFを発現する内皮細胞を刺激することができる。 典型的に、血管要素におけるTFの発現は、拡大する血管内凝血又は、局部的な凝血の開始、すなわち血性形成を起こす。

組織因子は、試験皆内の端維芽細胞を含む培養物中のある血管 外細胞、未同定型の精細胞及び循底膜パリヤーにより、循環する 血質タンパク質から分離されている上皮細胞の表面上に排成的に 免現される。これら細胞上のTFの存在は、組織損傷の結果とし ての血液との接触でクロットを形成する。従って、TFは、暴血 システムが開始する器定である。

ハウウェル(Bowell) (アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー(As. J. Physiol.) 31 地1 頁(1312年))の報告は、TPを合む単関した超減タンパク質調整物は、リン罪費ークンパク質(リポタンパク質) 複合体として存在するときのみ類系を促進することができることを示す最初の報告である。典型的に、TP合有組織タンパク質の単離が、通常TPタンパク質と会しているリン歴質を除去してしまうので、単離したタンパク質を再踏質化することによるTPの接続的プロコアグラント活性の再構成が必要であることから、これら再構成の研究が多くの研究者によって行なわれてきている。例えば、番集活性の回復は、リン股質のタイプ、タンパク質に対するリン脂質の比、及び再構成

ら方法の使用は、有定量の単階で/VI a を入手することの困難性 のみならず、因子VI / VI a の不安定性によっても削限される。

プローズ等(上記)は、huTFに特異的なモノクローナル抗体の開発及び免疫類和性吸着体としてのそれらの使用は、因子は / Via 使用の制限によって起こる問題を回避できることを指達している。しかし、抗一huTFモノクローナル抗体は、放文献中には報告されていない。さらに、子牛のTFによって生じる2つのモノクローナル抗体(カーソン(Caraos)等、ブラッド(Blood)。662巻156頁(1985年))は、huTFとは免疫反応を起こさない(グハ(Guba)等、上記)。

(本発明の概要)

1 つの 監機において、本発明は、ヒトの組織因子重領(huTFb) タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わず か約12.000 塩益対を含む DNA断片を考案している。 は構造 遺伝子が、第1図の約1番から約283番で示されているアミノ 数残益を有するタンパク質をコードしていることが好きしい。 さ らに、 技構造遺伝子は、第2図の約130番から、約918番で 示されるスクレオチド塩器配列を有することが好ましい。

望ましい粒操においては、そのDNA断片は、第1の配列の5 * 末端と連続し、かつ、huTFhタンパク質のTミノ末端に結合したTミノ放残器リーダー配列をコードする第2の配列をも合む。その第1及び第2のDNA配列は一緒になって、ヒトの組織因子重額前額体(プレhuTFh)タンパク質をコードする温成構造遺伝子を定義している。抜張成構造遺伝子は第1図の約~32番から約263番で示されるTミノ放残器を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さらに、放混成構造遺伝子は、第2図の約34番から約318番のスクレオチド塩器配列を

有することが望ましい。

別の放技において、本発明は、ヒトの組織因子重領タンパク質をコードする1つの構造遺伝子を定義する第1のDNA断片と機能的に結合したベクターを含む組換人DNA分子を考案している。さらに複組換入DNA分子は、第1の断片の5、末端に連続し、上記タンパク質に結合するアミノ改残器リーダー配列をコードする第2のDNA断片を含むことが好ましい。すなわち、上記の第1及び第2のDNA断片は一緒になって、上記タンパク質の前駆体をコードする提成構成遺伝子を定義している。

別の危機において、本発明は、わずか約50アミノ酸液器を含み、かつ式

- VNQVYT-

で扱わされる配列に相当するアミノ放張器配列を含むヒトの組織 因子結合部位のポリペプチド類似物を考定している。

さらに好ましくは、本発明はわずか約5 B アミノ酸残器を含み、かつ、

- TZIOVIYVOKV -

- FAAAK2222ERKI -

からなる耳から選択される式で表わされる配列に相当するアミノ 放残器を含むヒトの組織因子結合部位のポリペプチド類似物を考 返している。

さらに本発明の駐機には、

*) ヒトの組織因子重領タンパク質と免疫反応する。

b)

からなる耳から選択される式で扱わされるボリペプチドと免疫 反応する、

c) 実質的に第1図の部位204から部位226で示される式で 表わされるポリペプチドとは免疫反応しない、

抗体分子を含む抗体組成物である。

また、本発明は、ハイブリドーマTF8-5G3、TF9-10H10、TF9-5B7及びTF9-6B4と、それらハイブリドーマによって生成される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を考案している。

本杂明世。

- ⇒) 身体試料を、ヒトの組織因子重値タンパク質と混合し、免疫 反応混合物を作る、
- b) その混合物を、抗体が、その試料中に存在するヒトの組織因 子と免疫反応し、免疫反応度物を作るのに十分な時間維持する、 そして、
- c) ステップ b) で生じた免疫反応度物の存在を検出する、 以上のステップを含む体征試料中のヒトの組織因子重額タンパク 質の存在を検定する方法も考案している。

また、本発明は、

- ョ) 生理学的に許容される希釈剤及び効果的な生体内指示手段と 結合させたハイブリドーマTF9-10H10によって作られ たある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を被検者 に静脈注射により投与し、血栓中に存在するヒトの組織因子と 免疫反応させる。
- b) 協抗体分子が、血栓の一部として生体内に存在する組織因子 と免疫反応し、かつ、免疫反応動質を形成するのに十分な時間、 その投与を受けた被検者を維持する、
- c) ステップb) で生成した免疫反応生成物の存在を検定する。 以上a) ~ c) のステップを含む、生体内で血栓を検出する方法 も考案した。

さらに、本発明は、TF8-5G8及びTF9-6B4からなる群から選択されるハイブリドーマにより生産され、存在するとトの組織因子と効率よく結合する、ある量の抗体分子を含む生理学的に許容される特別利を含有するモノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈性射によっと投与することを含む、生体内で、疫薬因子リノMaと結合するヒトの組織因子の能力を中和する方法も考案している。

また、本発明は、因子などは。と反応するのに有効な量の、

る希釈剤を含有するポリペプチド組成物を、静脈注射で被検者に 投与することを含む、生体内で、ヒトの組織因子が、凝集因子は /ほっに結合することを照容する方法を考案している。

別の監接において、本発明は、本発明の抗体組成物を含有する パッケージを含む、試料中のヒトの組織因子重質タンパク質の存 在を検定する、キットの形をとった診断システムを考案している。 その抗体組成物は、

- a) TF8-5G9.
- b) TF9-6B4.
- c) TP9-10H10,
- 4) TF9-5B7.

からなるハイブリドーマの野から選ばれたハイブリドーマにより 生度されるモノクローナル抗体を含むことが望ましい。

また、試料から血液凝集因子M/Waを単版する方法も考案された。

この方法は、

- a) 固体マトリックスに固定した、請求項15記載のポリペプチ ドを含む固体サポートと試料を混合することにより結合反応提 合物を作る、
- b)上記結合反応認合物を、上記發集因子が上記ポリペプチドと 結合し、固体複合体及び上情を作るのに十分な時間、維持する、 c)上記複合体から、上記上情を分離する、そして
- d) ステップ c の分離した複合体から、上記職集因子を回収する、以上、 a.) ~ d) のステップを含む。

さらに、実質的に、ヒトの組織因子軽額タンパク質を含まない、 生物学的に活性のあるヒトの組織因子重額タンパク質の水溶液を 含む組成物を含素した。この生物学的に活性のあるヒトの組織因

からなる耳から選ばれるポリペプチドを含む生理学的に許容され

子重線タンパク賞は、リン設置又は、非イオン性界面密性剤中に 分散されていることが望ましい。

血管系統体試料中の凝集能力を検定するための、キットの形を とった診断システムも考案された。それは、実質的にヒトの組織 因子軽額タンパク質を含まない、少なくとも1回の検定を行うの に十分な量の、生物学的に活性のある、ヒトの組織因子重額タン パク質の水溶液組成物を含有するペッケージを含む。その重質タ ンパク質は、リン脂質中に分散されていることが望ましい。

別の態様において、成熟したヒトの組織因子重復タンパク質の 調製法及びその方法によるタンパク質発現産物も考案されている。 この方法は、

- b) その培養物を、上記細胞が、上記組換え DNA分子からタンパク質を発現し、かつ、上記成動型のタンパク質を形成するのに十分な時間維持する、そして、
- c) 上記培養物から、上記放熟型のタンパク質を回収する、以上a)~c) のステップを含む。

図式の簡単な疑明

図式は本公開の一部を形成している。

第1回は、1文字アミノ酸残器コードを用い、左から右に、ア

トン (k) で示した見かけの分子量をもつ分子量模準物質を示している。

第5回は、15%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、
因子リノリョの観和性で単離した h u T P のオートフルオログラムを示している。 h u T P の単離、**** I によるラベル化及び電気泳動は、例4と同様に行った。レーンA は、D T T による運元後の単離した h u T P を示している。レーンB は、D T T 運元なして、電気泳動した同サンプルを示している。上のバンド及び下のバンド(U及びLと要示した)は、各々、約58及び47kの大きさのh u T F に対応している。オートフルオログラフィー後、上のバンド及び下のバンドを切り出し、D T T を含む S D S サンプルバッファ中で再次和し、第2の15%アクリルアミドゲルのサンブルバッファ中で再次和し、第2の15%アクリルアミドゲルのサンブルのカェルに入れ、電気泳動した。レーンC は、レーンB から得られた、下のバンドの再電気泳動の結果を示している。125及び47キロダルトン(k)の見かけ上の分、子費をもつタンパク質が矢印で示されている。

第6図は、例4で説明されているように、まずhuTF特異的 モノクローナル抗体で免疫は酸化し、ついで8~17%のポリア クリルアミド勾配ゲルで電気泳動した、因子MI/MI = の観和性で 東陸したhuTPのオートフルオログラムを示している。レーソ Aは、DTTによる選元を伴う、電気泳動した「**」ラベル化 huTPを示している。レーンBは、選元なして電気泳動した同 サンプルを示している。

第7回は、15 光アクリルアミドゲル中で電気決動した、因子 ロノVIsの規和性で単語したカロTFのオートフルオログラムを 示している。単難、'*** I によるラベル化、選元及び脱グリコシ ミノ末協からカルホボキシ末端の方向で、ヒトの観複因子重像タンパク質の放射型及び割類体(各々、 h u T F h 及びブレbuffb)の完全なアミノ散残器配列を示している。主な天然の成動型タンパク質のアミノ散残器配列は、1 書から2 6 3 号に対応する。マイナーな成熟型タンパク質の配列は、3 号のアミノ散残器があらったり、2 6 3 号の残器で終わる。成熟プロセスで除去の対立さり、2 6 3 号の残器で終わる。成熟プロセスで除去配列は、マイナダー配列(前駆体領域)に相当するアミノ放残器配列は、マイナス号号で示した。和取外ドメイン及びトランスメンブレン・アンカー領域は各々、部位1~2 1 9 及び2 2 0~2 4 2 に対応する。第2 図は、1 文字ヌクレオチド塩番コードを用い、左から右に5・末端から3・末端の方向で、プレトu T F h 及び欠る。トu T F h の構造遺伝子は塩基130から始まり、塩基918で終わる。

その読み枠は、各アミノ数を示す1文字を、対応するコドンの 中央の塩盃上に置くやり方で、ヌクレオチド配列の上に推察され るアミノ政残器を付置することにより示した。

第3回は、例2で説明されている、hu丁Fの凝血活性を制定するのに用いる、凝集検定を示す図である。阿対数プロットは、 むとミリリットル当りのピコグラムで表わしたとトの組織因子 (hu丁F) 漢度で示される、ヒトのクエン酸化血圧蒸集(森血) 時間を示したものである。

第4回は、10 メポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、 因子リノリ a 親和性で単群した h u T F h のオートフルオログラ ムを示している。レーンA は、例 4 で説明されているように、単 離され、電気泳動前に、ジチオスレイトール(D T T)で理元した126 [ラベル化 h u T F を示している。レーンB は、キロダル

ル化は、例4で説明されているように行った。レーン1は、キロダルトンで扱わされた見かけ上の分子量をもつ複雑物質として電気泳動したタンパク質複雑物質:リゾチーム、14.3;カルボニック・アンヒドラーゼ、30.0;オパルブミン、46.0;ウシ血清アルブミン、69.0; ホスよりラーゼも、92.5; ミオシン、200.0(すべて11 H、アーリントンハイツ・アマーシャム社より入手)を示している。'** IートロTFを含むサンブルをDTT存在下(レーン2及び3)又は非存在下(レーン4及び5)で電気泳動した。これら'** IートロTF合有サンブルのいくつかは電気泳動的に脱グリコシル化し(レーン3及び5)、他のものは脱グリコシル化しなかった(レーン2及び4)。

レーン 8 及び 5 に流した^{18 1} ! - h u T P 含有サンプルは、電 気泳動前に脱グリコシル化され、レーン 2 及び 4 のものは脱グリ コシル化しなかった。

第8回は、例9で説明されているように、10%のポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、免疫観和性で単離されたhoffのオートフルオログラムを示してい。レーン1は、キログルトンで表わされる見かけの分子量をもつ、マーカーとして電気泳動した循準タンパク質:チトクロムC、124:ラクトグロブリン、184:カルボニック・アンヒドラーゼ、29.0:ラクテート・アヒドロゲナーゼ、36.0:オバルブミン、43.0:グルタメート・デヒドロゲナーゼ、55.0:及びホスホリラーゼ b、95.5(全て、M人州ニュートンセンターのディバーシファィド・バィオテク(Diversified Biotach.)から入手した)も含んでいる。レーン2は、スミス(Saith)等のBCAタンパク質検定法

(アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. biochen.)150 冬、76~85頁(1985年))を用いて湖定し、かつDTT を用いて選元した約20μ8のタンパク質を含んでいる。huff 質額(huTFh)は、明らかに、およそ47Mrの位置に確認 され、huTF軽額は、およそ125Mrの位置にわずかに確認 された。タンパク質は、レムリ(laemall)(ネイチャー(hature)、 227巻、680~685頁(1970))の報告に彼がい、コ マージ・ブルー染色により可彼化した。

第9図は、 $huTFhの非リン語質化(非語質化)ボリベプチド類似物による、<math>huTF由来の凝集開始阻害の较与一応答曲線を示すグラフである。 種々の満度の非器質化ポリベプチドによる凝集阻害率は、例12に健功されているように測定した。 テストしたポリベプチドは、<math>p26-49(\Delta TF26.49)$ 、p121-155(O、TF121、155)、<math>p146-167(Φ、TF146、167)及びp204-226(甲、TF204、226)である。

第10回は、AuTFAのリン暦費化した(暦質化した)ポリペプチド類似物による、AuTF由来の凝集開始限害に関する投与一応答曲線を示すグラフである。その限害率は例9で投明されているように、両方法により、関類似物に対して測定した。

例19に述べられているように例定した。白丸(O)はTF8-5C9抗体を示し、暴丸(●)は無関係の抗体を示している。

第16図は、抗丁ドモノクローナル抗体丁ド8-5G9による特製したヒトの陽丁ドの凝血活性の阻害を示している。リン設質ベンクル中に再構成された、特製したヒトの陽丁ドの凝血活性は、様々の速度の複製 I s G C と、37 で 30 分間、前処理した後例定した。丸は、抗丁ド抗体丁ド8-5 G9に対するもので、三角は、無関係なコントロール抗体ドム b 100 に対するものである。データは、抗体を加えない場合の活性に対する阻害率として表わされている。

第17回は、精製した抗丁ドモノクローナル抗体で処理した、 培養されたJ82勝脱がん細胞に対する阻容因子19の結合及び、 その細胞による因子Xョの形成を示している。因子Xョの形成本 の阻害の値は、三角で表わされ、因子14の結合阻害の値は、丸で 表わされている。データは、抗体を加えないでインキュペートし た細胞を用いて得られる値に対する阻害率で表現されている。パ ネルAは抗体丁ド9-2C 4 の効果、パネルB は、抗体丁ド9-5 B 7 の効果を示している。

第18回は、何25で述べられているような、免疫観和性で章 魅したカロTFのウェスタンプロット分析を示している。15%ポリアクリルアミドゲルに次に示すものがかけられた。レーン1は、キロダルトン(k)でパネル人の左に示された見かけの分子量をもつ分子量確節が含まれる。レーン2は、電気泳動前に選元された、検製ヒトヘモグロビン1gを含んでいる。レーン3は、単離したカロTFを電気泳動前に選元したもの0.5μgを含んでいる。レーン4は、非選元の、単離されたカロTF0.5μgを含んでいる。SDS-PAGE後、生じたタンパク質パンドを電気

3 ′の方向で含んでいる。また、例15で述べられている様々の 組換えDNA分子を構築するのに用いられた挿入物内の制限酵素 切断部位のおよその位置も示されている。さらに、完全な形で示 されるリーダーペプチド(「シー)及びトランスメンプレン・ア ンカードメイン(2000)をもつプレカップドカタンパク質のお よその位置も示してある。

第12図は、トuTFトの非リン型質化(非難質化)ポリペプチド類似物による、トuTF由来の概無関始の図客を示す、没与一応答曲線のグラフである。モル構度で表わした機々の機度の非腱質化ポリペプチドによる磁集の図客率(※)は、例12に述べられているように測定した。試験したポリペプチドは、p24~35(△)、p26~49(○)、p152~169(□)及びペプチドp40~71、p72~104、p94~123及びp161189であるがこれらは全て、実質的な図客を示さず、無約的に異丸(◆)で示した。

第13回は、TF8-5G9抗体組成物による凝集図客の速度 給を示すグラフである。凝集の図客平(54)は、例18で述べら れているように制定された機々の抗体免疫反応時間にわたってプ ロットしてある。

第14回は、カロアド由来の数集の抗カロアド抗体による図客 の技与一応答を示すグラフである。積々の濃度の抗カロアドモノ クローナル抗体アド8-5G9による基集の図客率(火)は例 19に述べられているように測定した。

第15回は、カロTF液がヒトの繊維芽細胞系列GM1381の細胞玻璃物である、カロTF由来の新集の、抗カロTF抗体による阻害の投与一応答のグラフである。様々の規定の抗カロTFモノクローナル抗体TF8-5G9による振気の阻害率(※)は、

発明の詳細な説明・ A. 定義

アミノ酸: ここで同定される全てのアミノ酸は、天然の1 一型のものである。 複準的ポリペプチド命名法に従がい (ジャーナル・オブ・パイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、243 巻、3557~59頁(1969))、アミノ酸残差の略号は、次の服会後に示されているとおりである。

対 応 異

32	号	アミノ放
1文字	文文字	•
Y	Tyr	チロシン
C	G 1 y	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
М	Met	メチオニン
Α.	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
L	J 1•	イソロイシン
L	Les	ロイシン
T	Thr	スレオニン
v	V =1	ベリン
P	Pro	プロリン

ĸ	Lys	リジン
н	Hia	グルタミン
Q	Gla	グルタミン
E	Gls	グルタミン酸
w	Trp	トリプトファン
R	Arz	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Ass	アスパラギン
С	Cys	システィン

ここでは、全てのアミノ改配列は、従来どおり左から右に、アミノ政末端からカルボキシ末端への方向で示されていることに注意を娶する。さらに、アミノ政残益配列の始め又は終りのダッシュは、各々、アミノ及びカルボキシ末端のH及びOH(水煮及び水設益)のようなラジカルへの結合、もしくは、ボリベプチド値における1から約15残益の1つ以上のアミノ設残益配列を示している。

タンパク質:タンパク質は、ポリペプチドのように互いに値鎖 ・ 的に結合した50以上のアミノ酸残器を意味して用いられている。

ヌクレオチド: 標部分 (ペントース)、リン酸及び窒素へテロ 類塩基からなる DNA又はRNAの単量体ユニット。この塩基は グリコシド炭素 (ペントースの 1 、炭素) を介して糖部分と結合 しており、塩基と糖の組合せはヌクレオシドと呼ばれる。ヌクレ オシドがペントースの 3 、又は 5 、部位に結合するリン酸器を含

パク質をコードする構造遺伝子を形成するDNA配列がDNA断 片中に含まれることが望ましい。その遺伝子はhuTFh又はプレhuTFhタンパク質中にあるアミノ酸残器をコードする各コ ドンが中断することなく連続して存在する、すなわち、イントロー ンを含まない遺伝子であることが好ましい。

従って、第2回に示される、5′末頃の約130番から、3′末時の約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、b u T F b を発現することができるD N A 断片が本発明の I 旅機を構成している。第2回に示される、約34番から約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、プレカ u T F b を発現できるD N A 断片が、本発明のもう1つの総様を構成している。

可溶性プレカロTFAをコードする、好食しいDN人断片は、 それらが、第1団で示されるように、-32者から0巻までのアミノ酸残益で示されるような、アミノ末端リーダー配列を含むタンパク質をコードしていること以外は、可溶性カロTFAをコードしているものと同じである。従って、可溶性プレーカロTFA むとき、それをヌクレオテドと呼ぶ。

塩基対(bp);二本質DNA分子内でのアデニン(A)とチョン(T)又はシトシン(C)とグアニン(G)の組合せ。 B.DNA斯片

生物において、タンパク質又はポリペプチドのアミノ散配列は 遺伝子コードを介して、そのタンパク質をコードする構造遺伝子 のデオキシリポ抜散 (DNA) 配列に直接関係づけられる。従っ て、構造遺伝子は、それがコードするタンパク質又はポリペプチ ドのアミノ酸残差配列で定義することも可能である。

重要でかつよく知られた遺伝子コートの性質にリダンダンシーがある。すなわち、タンパク質を作るのに用いられるほとんどのアミソ改に対し、1つ以上のコードするヌクレオチド・トリプレット (コドン) が、1つのアミノ改残器をコード又は指定している。それ故、1つのアミノ改残器配列をコードするのに多くの異なるヌクレオチド配列が存在することになる。そのようなヌクレオチド配列は、全ての生物において、同じアミノ改残器配列を生産することが可能なので、機能的には等価であると考えられている。場合によっては、プリン又はピリミジンのメチル化物がヌクレオチド配列の中に超込まれている事もある。しかし、そのようなメチル化は、コード関係にはなんら影響しない。

本発明のDNA断片は、ヒトの組織因子重額タンパク質(hulfh)をコードするDNA配列を合むという特徴をもつ。好ましい監視において、このDNA断片は、ヒトの組織因子重額前駆体タンパク質(プレルuTFh)をコードするDNA配列を含んでいる。すなわち、本発明のDNA断片は、huTFh、また、よう好ましくは、プレーカuTFhの構造遺伝子の存在で特徴づけられる。さらに、可溶性のカロTFh又は可溶性のプレーhuTFhタン

をコードする構造遺伝子を形成している、好ましいDNA断片は、 基本的に、第2図で示されている5・末端の約34番から756 母を経由して、3・末端の約801番で示される配列を含んでい る。典型的な好ましい可溶性のプレカロTFカコードのDNA断 片とは、第2図で示されているところの、約34番から約756 番、約34番から約771番、約34番から約786番及び約 34番から約801番のヌクレオチド塩器配列を有するものであ

可溶型も含めて、上にカロTFト及びプレカロTFトタンパク 質をコードする相関的DNA及びRNAも先に関請したように考 答された。

カuTF h及びプレhuTF hをコードするDN A 断片は化学的技術、例えばマテウシ(Natteocci) 等のホスホトリエステル法 (ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー・(J. Aa. Chea. Soc.) 103巻3185頁(1981年))により容易に合成できる。(ここで引用されている技術の公開は参考として超込まれている。)もちろん、コード配列を化学的に合成することにより本来のアミノ酸残器配列をコードする代りに適当な塩器を用いることにより、いかなる修正も望みどおりにすることができる。しかし第2回に示されているものと全く相同的な配列を含むDN A分子の方が望ましい。

さらに、基本的に h u TF 及びプレ h u TF h タンパク賞をコードする構造違伝子を含む D N A 断片は、これらの遺伝子を含む 組換え D N A 分子から得ることができる。例えば、プラスミドタイプの組換え D N A 分子 p C TF 6 4、p C TF 3 1 4 及びpCTF 4 0 3 はいずれも h u TF h 及びプレ h u TF h タンパク質の異なる領域をコードする D N A 区列を含んでおり、また、これらを 合せると、各タンパク質を発現するのに必要な金でのDNA配列 を有することになる。各々、pCTF64、pCTF314又は pCTF403でトランスホームした大陽菌の治養物は、1987年 3月27日、ブダベスト協定に益づき、MD州、ロックビル、パ ークローン、ドライブ12301者、アメリカン・タイプ・カル チャー・コレクション(ATCC)に保管され、各々、受理番号 67370、67368及び67369が割当てられた。

huTFh又はプレhuTFhをコードするDNA位列を含む DNA断片は、よく知られている方法を用い、先に述べた各プラスミドからの適当な制限断片を機能的に結合することにより作ることができる。典型的に、本方法で作られた本発列のDNA分子は、粘著末端、すなわちこの分子の二本領領域を越えて伸びた
* 突き出した。一本領領域をもっている。本発明のDNA分子上に粘著末端があることは望ましいことである。

本発明は、上述のDNA断片と等価なり求技数(RNA)も含 支している。

C. 組換えDNA分子

本発明の組領人DNA分子は、本発明のDNA断片をベクターに機能的に結合することにより作ることができる。

ここで用いられているように、 "ベクター"という言葉は、 初 脚中で目已複製できる DNA分子で、 別の DNA 断片を機能的に 結合することができ、 その結合した断片の複製をもたらすものを 寒味する。 h u TFh 及びプレト u TFh 遠伝子の発現を 可ることができるベクターは、ここでは "発現ベクター"と呼ばれる。 従って、 超換え DNA分子 (r DNA) とは、 天然においては 遺 常一緒にいることはない少なくとも 2 つのスクレオチド配列を含むハイブリッド DNA分子のことである。

バイオラド・ラボラトリーズ社) 及びpPL、pKK223(NJ 州、ピスカタウュイ、ファルマシア社) がある。

実技知数、好きしくは脊椎生物細胞と適合する発現ベクターも、本発明の超換えDNA分子を作るのに用いられる。実技細胞発現ベクターもこの分野でよく知られており、数社から市販されている。 真型的にはこれらのベクターは、目的とするDNA断片の挿入に便利な制限部位を含んでいる。これらのベクターの真型的なものには、pSUL及びpKSV-10(ファルマシア社)、pBPV-1/pML2d(インターナショナルバイオテクノロジー社)及びpTDT1(ATCC。#31255)がある。

好変しい態操において、本発明の組換えDNA分子を機能するのに用いられる真状性和助発現ペクターは、真状性和助中で効果的な選択マーカー、好変しくは、薬剤耐性選択マーカーを含んでいる。好変しい薬剤耐性マーカーとは発現によりネオマイシン耐性となる遺伝子、すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo) 遺伝子である。サウザーン(Southern)等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス(J. Bol. Appl. Genet.)1 巻、327~341頁(1982年)。

本発明のIDNAを作るための、レトロウイルス発現ベクターの使用も考案されている。ここで用いられているように、*レトロウイルス発現ベクター*とは;レトロウイルスゲノムのロング・クーミナル・リビート (LTR) 領域由来のプロセーター配列を含むDNA分子を意味する。

好ましい駐機において、典型的な発現ベクターは、真体細胞中では複製不能なレトロウイルス発現ベクターである。レトロウイルス発現ベクターである。レトロウィルスの構築と使用法は、ソージ(Sorge)等により解告されてい

本発明のDNA断片を機能的に結合させるベクターの選択は、この分野ではよく知られているように、例えば、タンパク質の発現などの機能的性質及びトランスホームされる宿主細胞などが超換えDNA分子の構築技術の上で本質的な制限となることから、これらに直接依存する。しかし、本発明によって考案されたベクターは、これに機能的に結合しているDNA断片中に含まれる hu TFh 又はプレカロTFh 遺伝子の、少なくとも複製を、好ましくは発現をも可能にする。

好きしい酸様において、本発明により考案されたベクターは、 原核性のレプリコン、すなわち、バクテリア宿主相胞のような原 核細胞中の、これをトランスホームした染色体外組換えDNA分 子の百己複製及び維持を可能とするDNA配列を含んでいる。こ のようなレプリコンは、この分野ではよく知られている。さらに、 原核性レプリコンを含むこれら胎様は、これをトランスホームし たバクテリア宿主に運利耐性を与える遺伝子も含んでいる、典型 的なバクテリアの取剤耐性遺伝子は、アンピンリン又はテトラサ イクリンに対する耐性を与えるものである。

原体性レブリコンを含む、これらのベクターは、これをトランスホームした大陽菌のようなバクテリア宿主細胞中で、bulph 又はプレカuTFbに伝子を発現(転写及び翻訳)させることができる原体性プロモーターも含んでいる。プロモーターとは、RNAポリメラーゼの結合を許し、転写を開始させる、DNA配列でできた発現コントロール要素である。バクテリア宿主と適合するプロモーター配列の典型的なものは、本発明のDNA断片の対入に便利な制限部位を含むプラスミドベクター中に存在する。このようなベクタープラスミドの典型的なものには、pUC8、pUC9、pBR329 (CA州、リッチモンド、

る(モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(No). Cell. Biol.) 4巻、1730~87頁(1984年)。

相補的なホモポリマー末端を介して、DNAをベクターに機能的に結合する多くの方法が開発されてきている。例えば、相補的なホモポリマーを、挿入するDNA断片及びベクターDNA 断片を相加することができる。それから、このベクターとDNA 断片を相補的ホモボリマー末端間の水素結合で結合し、組換え DNA分子を作る。

1 つ以上の制限的位を合かりという。 欠い A 断片をベクターには合するもう1 つの方法を提供する。 免に報告されているように、エンドヌクレアーゼで制限情化することによって生成したり、エンドヌクレアーゼで制度情化することによって生成したり、エンドヌクレアーゼを指性で、 くほんだ3 7 末端を除き、また重合活性で、 くほんだ3 7 末端を除き、また重合活性で、 くばれだ3 7 末端を除き、また重合活性で、 ハムボリメラーゼ 1 で、 これのでは、 ではずる。 従って、 これのでで、 ではない ア滑末端 D N A がけまする。 それから こことができる。 それから こことができる。 アクテリオファージョンを触媒することができる。 では、 アクテリオファージョンを触媒することができる。 できる。 では、 大過剰のリンカー分子とカーン のようのようにこのの 東端を作る 時常で切断した発現ベクターとライゲーションする。

多様の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーは、 CN州ニューへブン、インターナショナル パイオテクノロジー 社を含む多くの会社から市販されている。

本発明は、上述の組換えDNA分子と等価なRNAも考案して

いる。

D. トランスホームした知路と培養

本発明は、本発明の組換えDNA分子、好ましくは可溶性の h u T P h 又はプレh u T P h を発現できる r D N A でトランス ホームした宿主相胞にも関連している。この宿主細胞は、原体性 でも実体性でもよい。バクテリア細胞は、原体宿主細胞であるこ とが好ましく、また典型的には、ND州ベセスダ・リ サーチラボラトリース社から入手できる大腸密DH5株のような、 大陽雷の珠である。好ましい真核性宿主細胞には、イースト及び 本乳類細胞、好ましくはマウス、ラット、サル又はヒトの総維芽 細胞には、C C L 6 1 として A T C C から入手できるチャイニー ス・ハムスターの卵巣(C H O)細胞及びC R L 1 6 5 8 として A T C C から入手できるN 1 H スイスマウス胚細胞がある。

本発明の組換え DNAによる通当な知胞宿主のトランスホーメーションは、典型的には用いるベクターのタイプに応じて、よく知られている方法により行なわれる。例えば、原体性宿主和胞のトランスホーメーションに関しては、コーエン(Cohen) 等のプロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natil. Acad. Sci.) USA、69巻、2110頁(1972年):及びマニアチス(Haniatis)等のNY州コールド・スプリング・ハーバー・コールド・スプリングハーバー・ラボラトリー、ラボラトリー・マニュアル、モレキュラー・クローニングを参照せよ。等推動物細胞の「DNAを含むレトロウイルス・ベクターによるトランスホーメーションに関しては、例えば、ソージ(Sorge)等、モレキュラー・アンド・セルラー・パイオロジー(Hol. Cell. Biol.)4巻、1730~37頁(1984

年)、グラハム(Graham)等、ウィロロジー(Virol.)。 5 2 色、4 5 6 頁(1 9 7 3 年): 及びウィグラー(Wigler)等、プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl, Acad, Sci.) U S A、 7 6 巻、1 3 7 3 ~ 7 6 頁 (1 9 7 9 年) を参照せよ。

うまくトランスホームされた細胞、すなわち、本発明の組換え DNA分子を含む細胞は、従来の方法によって同定することがで まる。例えば、本発明のェDNAの導入から生じた細胞をクロー ン化し、モノクローナルコロニーを作る。これらのコロニーから 細胞を収穫し、溶解し、そのDNA内容物について、サウザーン (Southers)(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Hol. Biol.) 98巻、503頁(1975年)又は、ベレント(Borent)等(バイオテクノロジー(Biotech.)3巻、208 頁(1985年)によって報告されている方法を用いて、その ェDNAの存在を調べた。

rDNA存在の直接的検定に加え、成功したトランスホーメーションは、そのrDNAがAuTFA又はプレAuTFAを発現することができるときは、従来の免疫学的方法で確かめることができる。例えば、発現ベクターでうまくトランスホーメーションできた短胞は、AuTFA又はプレAuTPA抗原性を示すタンパク質を生産する。トランスホームさせた細胞は料を収穫し、本発明のハイブリドーマによって生産される抗原等に特異的な抗体を用い、AuTFA又はプレAuTPAを検定する。

このように、トランスホームした宿主相談それ自体に加え、本 発明は、栄養培地中のそれらの細胞の培養物好ましくは、モノクローナル (クローン的に均一な) 培養物、又は、モノクローナル 培養物由来の培養物も考定した。この培養物は、カロTFN又は

プレカッTFカ抗原性を示すタンパク賞、またさらに好をしくは、 生物学的に活性なカッTFカを含むことが望ましい。

トランスホームした店主網路を将奏するのに有用な栄養培地は 当分野ではよく知られており、また、いくつかの販売会社より市 販されている。宿主網路がお乳類細胞であるような監禁において は、「無血液」・培地を使うことが望ましい。

B、huTFA及びプレhuTFhタンパク質の生産方法

本発明の別の特徴には、 h u T F h 抗順性を示すタンパク質の 生 屋方性がある。 h u T F h 抗原性を示すタンパク質は天然の組 機因子によって誘導される抗体を免疫反応を起こすタンパク質で ある。 h u T F h 抗原性を示すタンパク質は、抗順として有用で あり、又、抗体を生じさせるときにも有用で、その各々が本発明 の体質システムやな断性で使用することができる。

本方法は、huTFh又はプレhuTFh、好なとくとでいるとしている。なの方法により、A分子でトランスホームした宿主知路、けましくは、ヒトの相称を含有する栄養培地をおいる。この培養を、そのトランスホームした相配がかは可下Fhタンパク質を発現するのに十分な時間に対する。この培養を、そのトランスホームした相配がかは可下Fhタンパク質を発力がも回収する。好なしいの方法によって作られたhuTFhの生物が成質は、おいて、本発明の方法によって作られたhuTFhの生物が活性すなわち、因子リンパク質を発現では、宿主細胞においてプレトはTFhを能力を発現できる。その培養によす、プレカロTF和類宿主組設の培養を含んでいる。そのヴレトロTF和類宿主組設の培養を含んでいる。そのヴレトロTF和の知识後の修正が起こり、生物学的に活性のあるhuTFhタンの例訳後の修正が起こり、生物学的に活性のあるhuTFhタンの例訳後の修正が起こり、生物学的に活性のあるhuTFhタンの例訳後の修正が起こり、生物学的に活性のあるhuTFhタンの例訳後の修正が起こり、生物学的に活性のあるhuTFhタン

バク質が生じる。

培養物から、発現したタンパク質を回収する方法は、当分野ではよく知られたことであり、従来の生化学的方法を用い、その培養物のタンパク質合有百分の分面が含まれる。例えば、タンパク質の分面に対して知られているゲルは過法、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティ・クロマトグラフィー及びそれに類するものが、培養物中にある発現タンパク質の単離に用いることができる。さらに、免疫観和性、免疫吸着やそれに類するもののような、免疫化学的方法も、従来法を用いて行なわれる。

F、 A u T F A 及びプレ A u T F A タンパク質組成物と発現度物本発明は、また本発明の r D N A の A u T F A 及びプレAu I F A タンパク質発現産物も考案している。好きしい筋操において、 A u T F A 及びプレA u T F A 発現度物は第1回で示されているように、各々残器1から263及び-32から263に対応するフミノ散残器を有している。その発現タンパク質は、第1回で示されるプレA u T F A 及 u T F A の T ミノ散残器配列の長さの少なくとも90%、好きしくは少なくとも95%であることが望ましい。

別の監操において、可溶型のカロTF h 及びプレカロTF h と、可溶性カロTF h そして、または可溶性プレカロTF h を含む組成物も考案されている。ここで用いている。可溶性。という言葉は、本来のカロTF h 及びプレカロTF h 分子の細胞外ドメイン、すなわち、第1回に示すところのアミノ末端から残落220までの、カロTF h 及びプレカロTF h 分子領域を基本的に含むことを特徴とするカロTF h 及びプレカロTF h 分子を意味する。それゆえ、可溶性カロTF h 及び可溶性プレカロTF h は、本来の分子で形成されるトランスメンブレン・アンカー領域の実質的邸

分(第1図で示すところの残器220から242)を含まない。 ここで用いている。 A u T F A 。及び、プレ A u T F A 。という 言葉は今後特にことわらないかぎり、そのタンパク質の可溶型を 含んでいる。

可存性の h o T F h 及び可容性 プレト u T P h は、疏水的なトランスメンブレン・アンカー領域を含んでいないので、これらは、生理学的に許容される水溶液中で実質的に凝集することはない。それゆえ、可溶性の h u T F h 及び可溶性のプレト a C を b が 7 0 %、好ましくは約 8 0 %、そしてより好ましくは約 8 0 %(重量パーセント)が非磁気(単量体) 型であり、タンパク質温度的 0.1 p g / n f から約 1 0 0 n g / n f の 空理学的に阵容された 報 取 利 を f かられて いるところであり、 排除カラムクロマトグラフィーによるサイズ・分面を含んでいる。

好ましい可容性 h u T F h タンパク質は第1 図で示されているところの、アミノ末端の残器的1 書から、209 香を経由してカルボキシ末端の残器22 4 書で示されるアミノ放残器を示している。従って、好ましい可容性 h u T F h タンパク質は第1 図で示すところの約1 巻から約209 巻、約1 巻から約21 9 香及び約1 番から約22 4 季の残器で表わされるアミノ放残器配列を有するかのアネス

好ましい可称性プレトロTPトタンパク質は、第1図で示すところの、アミノ末端の-32番から、203番を経由して、カルポキン末端の224番の残酷で表わされるアミノ散残器を有している。 従って、好ましい可称性プレトロTFトタンパク質は、第

下、血管系統状サンプルを凝集する能力を意味する。凝集能力を 検定するのに十分な、奥型的 h u T F h タンパク質速度は、例 2 におけるサンプル/ h u T F h 比と同じ比を用いたとき、約 0.1 p s / m & から約 1 0 0 n s / m &、好ましくは、約 1 p s / m & から約 1 0 p s / m &、そしてより好ましくは約 1 0 p s / m & から約 1 n s / m & である。もちろん、凝集能力を検定するときに 必要な速度よりも高い速度であるが、好ましい速度に希釈しうる h u T F h 溶液も考慮されている。

好をしい結構において、huTFh合有水溶液は、リン陰質又は非イオン性界面括性剤中に分散されたhuTFhを含んでいる。 集型的リン腺質:huTFhタンパク質重量比は、約5:1から 12000:1、好きしくは、約50:1から約5000:1そ してきらに好ましくは、約100:1から2500:1の範囲で ある。

G. ポリペプチド

本発明の各ポリペプチドは、せいぜい約50個、より適常には 約35個以下の、そして好ましくは約25個以下のアミノ放残器 を含んでおり、かつ、少なくとも10個の残器を含んでいる。さ らに、本発明のポリペプチドは、そのアミノ放残器足列及び新し い機能特性を特徴としている。

従って、本発列のポリペプチドの1つの競技は、血液素無因子 リグリョへのAuTFAの結合を競合的に阻害する能力をその特 徴の1部としている、AuTFA結合部位ポリペプチド類似物で ある。本発明の結合部位類似物は活性化した複合体を作ることな く、すなわち、凝集を開始することなく因子などといった結合する ことが望ましい。

ここで用いている"複合体"という言葉は、抗原-抗体又は、

1 図で示すところの約-3 2 香から2 1 4 香、約-3 2 香から2 1 9 香、及び約-3 2 季から約2 2 4 香の残器で要わされるアミノ放残器配列を有するものである。

1 つの怠慢において、トロTFト及びプレトロTFト発露動は グリコシル化されていない。すなわち、それらは、本発明のIDNA でトランスホームした原体和散中で生産される。

非グリコシル化型のhuTFh及びプレhuTPhは、本発明の控徴物及び診断シスチムにおける免疫順及び抗原として有用である。

異型的には、真核細胞で生産されたカロTF h及びプレかのFP はグリコシル化されており、文た抗原性及び免疫原性に加えて、生物学的活性を有する。ここで用いられているように、"生物学的活性"という語句は、因子W/Waの依存の最無を誘導する能力をもつカロTF h 又はプレカロTF h タンパク質又はポリペプチドを指して使われる。

このように、本発明は、実質的にヒトの組織因子経額タンパク質を含まない生物学的に活性なカロTFAを含有する水棒液を含む組成物を含器している。その組成物も実質的に例えばラウリル硫酸ナトリウム等のイオン性界面活性剤、ポリアクリルアミド及びSDSーポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDSーPAGE)で測定される的、15000ダルトン以下の見かけの分子量を有する組織出来のタンパク質のような物質を含まないことが望ましい。

水溶性のカロTFト含有溶液は血液又はクエン酸化した血漿の ような血液由来の医物のような血管系液状サンプルの凝棄能力を 検定するのに十分な生物学的に活性のあるカロTFトを含んでい る。"磁無能力"という時句は生物学的に活性なカロTFト存在

レセプターーリガンド反応のような特異的結合反応の度物を意味 している。代表的複合体としては、免疫反応度物及びここでffi MI/Misと示されているところの組織因子 - 因子MI/Mis 結合反応度物がある。

好ましい態様において、カロTFh結合部位類似物は、少なく とも第1図に示されている30~35番のフミノ酸残器を表わし ている次に示すアミノ酸残器配列:

- VNQVYT-

を含んでいる。

さらに好ましくは、huTFh結合部位質似物は、少なくとも、 次のアミノ放残器配列:

-VNQVYTVQIST-AU

-LYYWKSSSSGKKT-

のうちの1つを含んでいる。

これらの配列は、第1図で示すところの各々、30~40及び 155~167番の、huTFhのアミノ数残器を示している。

さらに一層好主しい場合は、 h u T F h 結合部位類似物は第1 図で示すところの、各々26~49番及び146~167番で表 わされている、次のアミノ酸残益配列;

- EPKPYNOVYTVOISTKSEDWKSKC -.

- VFGHDLITTLYYWXSSSSGRKT - .

からなる群から選ばれたアミノ放張基配列を含む。

好ましいカロアドト結合部位ポリペプチド類似物は第1支で示されているアミノ設強益配列を含んでいる。

第 1 表

名 称*

アミノ放張器配列

a. 各ポリペプチドの実験名は第1図の、含まれているアミノ 酸残基配列を扱わしている。

ポリペプチドp26~49、p146~167及びp151~ 189も、抗トロTFト抗体分子がトロTFトに結合するのを中 和(数争的阻害)する能力を特徴としている。抗トロTFト抗体のトロTFトへの結合を中和する能力をもつ本発明の他のポリペプチドは、第2表に示されているものである。

第 2 表

名称

アミノ放残益配列

a. 実験名に付けられた。C。は、タンパク質結合のためのリ ンカーとして、示されている配列に付け加えられたシスティ

れる。リンキングに使われる典型的アミノ酸残落は、チロシン、システィン、リジン、グルタミン酸及びアスパラギン酸とそれに関するものである。さらに、本発明のポリペプチドは、末端2H。 基アシル化、例えばアセチレーション又はチオグリコン酸アミデーション、ターミナルカルポキシアミデーション、例えば、アンモニア、メチルアミン、その他により配列が修飾を受けていることで、天然の配列とは異なることがある。

キャリャー・ハプテンのように、当分野でよく知られているリンカーを介してのキャリヤーとの結合の場合、本発明のポリペプテドは、トロTFトと免疫反応する抗体を誘導することができる。免疫学的な交差反応性の明白な原則からみて、本発明は、第1表及び第2表で示されているポリペプチドの抗原的に関連したパリアント・とは、第1変もしくは第2表のポリペプチドの、少なくとも6個のアミノ酸残器配列領域を含み、かつ、第1表又は第2表のポリペプチド及びトロTFトと免疫反応を起こす抗体分子を誘導することができるポリペプチドのことである。

また、ポリペプチドがリン酸質又は非イオン性界面活性剤中に分散した、 h u T P h 結合部位ポリペプチド類位物の水性溶液を含む組成物を、本発明は考定している。 典型的なリン脂質:ポリペプチド重量注は、約5:1から200:1、好ましくは約30:1~80:1、さらに好ましくは、約45:1~5:5:1の範囲にある。リン脂質中に分散して使用するのに適している好ましい h u T P h 結合部位類似物をセクション10 第4表にリストした。

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドの分野ではよく知られているいくつかの方法で合放することができる。使用しうる多くの技術のすぐれたまとめは、J. N. スチワード (Steward) 及び

ン残器を示している。

本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドが因子リンリュへの結合に対し、本来の組織因子と競合でき、そして、または、 トロTFトに対する抗トロTFト抗体分子の結合を競合的に阻害 しうるかぎり、トロTFトのアミノ酸残器配列と同一である必要 がないことを理解すべきである。それ故、本ポリペプチドは、使 用する際に有利となるような、保存的、非保存的にかかわらず持 入、欠失及び置換のような強々の変化を与えることができる。

保存的置換には、あるアミノ酸残器が他の生物学的に同様の残器に置き換ったものである。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン又はメチオニンのような資水的残器間の置換又は、アルギニンとリジン、グルタミン酸とアスパラギン酸又はグルタミンとアスパラギン及びそれに類するもののような極性残器間の置換がある。また。保存的置換。という語句には、もし、ポリペプチドが、必要とされる結合活性を示すならば、未置換の元々のアミノ酸の代りに、置換されたアミノ酸を置いることも含まれる。

本発明のポリペプチドが、1つ以上の保存的、もしくは非保存的関係をしているために、本来のトッエドトの配列と同一ではない場合、本発明のポリペプチドがラベル又は固体マトリックス、又はキャリヤーにうさく固定する。リンカー。を提供する目的で、その各末端に付加的残益をつけ加える場合は別にして、アミノ政残器の遺席せいぜい約20パーセント、より普適には、せいぜい10%が電域している。本発明のポリペプチドと共に使用されるラベル、固体マトリックス及びキャリヤーは以下に述べる。

適常、アミノ酸残器リンカーは、少なくとも1残器であり、また40以上の残器のこともあり、レビレビ1~10残器が用いら

J. B. ヤング (Young) の* 固相ペプチド合成。 (1969年、サンフランシスコ、H. B. フリーマン (Freenam) 社) 及びJ. メイエンホーファー (Helephofer) の* ホルモン性タンパク質及びペプチド* (1983年、アカデミックプレス社 (ニューローク)、2 老、4 6 頁) が固相ペプチド合成について、またE.シュローダー (Schroder) とK.クプケ (Kubke) の*ペプチド*

(1965年、アカデミックプレス社(ニューヨーク)1巻)が 古典的な液相法について行なわれている。

B.接種物

別の股核において、本発明のポリペプチド又は、その抗順的に 関連したパリアントは、生理学的に許容しうる水性等权利組成物 として、その効果的量が投与された時、AuTFhと免疫反応する抗体を誘導することができる接種物となる。種々の文法型の *接種物*という話は、AuTFhに対する抗体の調製に用いられる活性成分として、本発明のポリペプチドを含む組成物として、ここで使用されている。ポリペプチドの抗体を誘導するのに用いられるとき、そのポリペプチドは、単独で、又は結合体としてキャリヤーと結合して、又は、ポリペプチド重合体として用いられるのであるが、表現の簡便性のため、本発明のポリペプチドの種々の転換は、全て、*ポリペプチド*という語及びその種々の文法型で呼ばれていることを理解されよう。

約3 5 以下のアミノ放残器を含むポリペプチドに対し、すでに 記されているように抗体生産の誘導のためには、キャリャーに結 合したペプチドを使用する方が望ましい。

すでに記してきたように、1つ以上の付加的アミノ改改基をポリペプチドのキャリヤーへの結合を助けるため、そのポリペプチドのアミノ又はカルポキシ末端に付加することができる。ポリペ

待表平1-503438 (13)

プチドのアミノ又はカルボキン末端へ付加したシスティン残器は、ジスルフィド結合を介して、結合体を行るのに特に有用であることが分っている。しかし、結合体を関盟の当分野でよく知られている他の方法も使用しうる。代表的付加結合法にはミカエル付加反応重勢、グルタルアルデヒドのようなジアルデヒド(クリプスタイン(Klipstein)等(ジャーナル・オブ・インフェクシャス・デシーズ(J. lapect. Dis)、147巻、318~326頁、(1983年))及びそれに摂するものの使用、又は、キャリヤーに対し、アミド結合を生ずる、水溶性カルボジイミドの使用ような、カルボジイミド法の使用が含まれる。活性官能器を介してのタンパク質の結合については、オーラメアス(Auraneas)等のスカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Scand. J. lasunol.)8巻、補1、7、7~23頁(1978年)を参照せ

有用なキャリヤーは、当分野ではよく知られており、一般的にはタンパク質そのものである。そのようなキャリヤーの代表例としては、キーホール、リンペット、ヘモシアニン (KLH)、エデスチン、チログロピン、子クシ血清アルブミン (BSA) やトト血清アルブミン (HSA) のようなアルブミン選、ヤギホ血球(SRBC) のような赤血球球、テタナストキソイド、コレラトキソイド、ポリ (D-リジン: D-グルタミン設) のようなポリアミノ改及びこれに鎖するものがある。

Ł.

キャリヤーの選択は、その接種物の最終的使用法に依存しており、本発明に特に関係しない基準に基づいている。例えば、接種される動物中で不都合な反応を超こさないキャリヤーが選択されるべきである。

本発明の接種物は、典型的には、キャリヤーに結合した結合物

として、効果的な免疫原量の本発明のポリペプチドを含む。他の事項の中で、単位投与量当りの効果的なポリペプチド量は、当分野ではよく知られているように、接種される動物構、その動物の体置及び選択した接種レジメンに依存する。典型的に、接種物は、接種(投与)当り約10マイクログラムから約503リグラムのポリペプチドを含んでいる。

本発明の接種物に用いられている"単位投与"という目句は、 キュニットが、必要とする希釈剤、すなわち、キャリヤー又はピ ヒクルと共に望ましい免疫原的効果を確むのに必要な予め決められた量の活性物質を含む、動物に対する1回の投与に適した物理 的に分離した単位を意味する。本発明の接種物の新しい単位投与 に関する明和は、何活性物質の独特な特性及びその独自の免疫学 的効果、及び何ここで詳細に公開されている動物中での免疫学的 使用に内在する制限により説明され、かつ直接依存しており、こ れらが本発明の特徴となっている。

典型的には、接種物は、水、金塩水又はリン酸機衡会塩水などの生理学的に許容された(受容である)希釈剤中にポリペプチドー結合体を分散させることにより、乾燥した固体のポリペプチド結合体から水性組成物を調製することができる。

また、接種物は希釈剤の一部として、アジュパントを含んでいる。完全フロイントアジュパント (CPA)、不完全フロイントアジュパント (IPA)及びミョウパンのようなアジュパントは、当分野ではよく知られており、いくつかの会社から市販されてい

1. 抗体及び抗体組成物

推々の文法型の"抗体"という話は、イムノグロブリン分子及

びイエノグロブリン分子の免疫学的に活性な領域すなわち抗体結合部位又はパラトーブを含む分子を意味する。代表的抗体分子には、本来のイエノグロブリン分子、真質的に本来のものと同じイエノグロブリン分子及びPab、Pab'、F(ab')。及びP(v)として、当分野で知られている領域を含む、パラトープを含有する、イエノグロブリン分子の一部がある。

本発明の抗体組成物は、buTFh及び本発明の特異的ポリペプチドの少なくとも1つと免疫反応を起こす抗体分子を含むことを特徴とする抗ペプチド抗体である。

例えば、 N u T F N 及び組織因子結合部位のポリペプラド類似物と免疫反応する抗体分子を含む、本発明の抗体組成物は組織因子が因子リノリッと結合する能力を中和できる。従って、好ましい抗体組成物は、 N u T F N 及び p 2 6 - 4 9 又は p 1 4 6 - 1 6 7 と反応し、かつ、 p 2 0 4 ~ 2 2 6 と変質的に免疫反応しない抗体分子を含むものである。 N u T F N に対して生ずるポリクローナル抗血清は、 p 2 0 4 - 2 2 6 免疫反応する抗体を含むことに注意すべきである。このように、抗 2 0 4 - 2 2 6 免疫反応性が実質的にないことが、本抗体組成物と従来の報告されているものとを区別する特性となっている。

本発明の抗体組成物の典型的生液は、水乳動物を、本発明の接種物で免疫化し、適当なポリペプチド免疫特異性を有する水乳質抗体分子を摂薄することによって行なわれる。 さらに、その抗体分子を表の水乳動物から収集し、例えば、免疫アフィニティ・クロマトグラフィーのような従来技術によって、その必要量を単態する。このように生産した抗体組成物は、なかんずく、診断法及び身体サンプルにおけるトロTFAを検出するための、本発明のシステムで用いることができる。

モノクローナル抗体組成物も、本発明で考案されている。検出 限界内で、モノクローナル抗体組成物は、効果的に h u T F h を 結合しうる、唯一種類の抗体結合部位を合んでいる。従って、典 型的に、本発明のモノクローナル抗体組成物は、それがh u T F h 以外のタンパク質を結合できる抗体をたとえ合んでいたとしても、 h u T F h への結合観和性を示す。ひとつの監控において、モノ クローナル抗体組成物は、 h u T F h 及び、組織因子結合部位の ポリペプチド類似物、好ましくは p 2 5 ~ 4 9 又は p 1 4 6 ~ 1 5 7 と免疫反応する抗体分子を合んでいる。

他の超機において、本発明は、huTFhと免疫反応し、 huTFhにより開始する凝集を阻害する抗体分子を含む抗凝集 (中和) MoAbを考案した。さらに凝集を阻害する好をしい MoAbは本発明のポリペプチド、好をしくは、huTFh結合部位ポリペプチド類似物、及びさらに好ましくは、第1表で示されているポリペプチドと免疫反応することを特徴とする。

他の監機において、抗暴無 MoAbは、 h u T F h 及びhuifh: 因子リンピョの複合体と免疫反応し、 h u T F h によって開始する凝集を阻害 (中和) する抗体分子を含んでいる。さらに、好ましい抗凝集 MoAbは h u T F h ポリペプチ F p 1 - 3 0 又はp26 - 4 8 と免疫反応することを特徴とし、またこれは、 h u T F h ポリペプチ F p 5 6 - 7 1 と免疫反応しないことが好ましい。

また、本発明は、組織因子の凝集を開始する能力を中和しない 抗体分子を含む非中和性モノクローナル抗体組成物も考案した。 そのような組成物は、 h u T F h 及びポリペプチド p 1 - 3 0 と 免疫反応し、かつ、ハイブリドーマT F 9 - 1 0 H 1 0 により生 産 (分泌) される抗体分子を含むことが望ましい。

本発明のモノクローナル抗体組成物は、適当なポリペプチド特

異性をもつ抗体分子を分泌するハイブリドーマを含有する栄養培 地を含む、モノクローナルハイブリドーマの培養を開始すること によって生産することができる。

このハイブリドーマが培地中に、その抗体分子を分泌するのに 十分な条件及び時間、培養を維持する。それから、抗体含有培地 を収集する。さらにこの抗体分子を従来法により早期する。

これらの超成物の調製に有用な培地は、当分野ではよく知られておりまた、市販されていて、合成培養培地、四血統業建マウス及びそれに類するものが含まれている。代表的合成培地は、4.5 g/gのグルコース、20 mグルタミン及び20 Mウン胎児血清を補足した、グルベコ級小培地(DMEM:グルベコ(Dolbecco)等、ヴィロロジー(Vivol)、8 巻、396頁(1959年))である。代表的同血繁殖マウス株はBalb/eである。上述の方法で生理したモノクローナル抗体組成物は、例えば、カロTFト含有免疫反応の形成が必要である、診断及び治療法で用いることができる。

1. ハイブリドーマ

本売明のハイブリドーマは、huTPhと免疫反応する抗体分子を生度することを特徴とする。さらに、好ましいハイブリドーマは、huTPhで開始する高無を阻害し、また、望ましくは、本発明のポリペプチド、好ましくは、huTPh結合部位ポリペプチド類似物、そしてさらに好ましくは、第1 英に示されているポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生度することを特徴としている。さらに好ましい強機においては、抗凝集MoAbは、非にト、霊品類、TIと免疫反応する。

他の好ましい態様において、本発明のハイブリドーマはhotFh 及びhuTPh;因子以/Usの復合体と免疫反応し、hoTFh

図。複合体形成速度の彼少によると考えられている。従って、生体内において、huTFh因子で/VI=特合部位よりペプテド類 仮物の投与は、凝集やある炎症反応のような、超機因子の因子で/ VI=への結合により開始する生理学的応答を調査するのに用いる ことができる。好ましい直接において、このポリペプチドは、先 に述べたように、リン脳質中に分散して投与される。

生体内における組織因子による因子はノロ。の結合を調節する他の方法は、本発明の抗体組成物(抗ペプチド抗体)又は抗磁気MoAbの効果量を静脈注射により投与することである。この抗体分子は、パラトピック領域を含み、かつイムノグロブリン分所片F(ab')。、Fab及びそれに関するもののような、Fc 領域を含まないものである。治療的に効果的量の抗凝集MoAbは、体量は当り15 μgから5 w、好ましくは体質は当り、約100 μgから約1 mc、より好なしくは、体重は当り約150 μgから約500 μgの範囲である。

他の駐機において、本発明のMoAb、抗發集MoAb又は非中和性MoAbの抗体分子を抗腫瘍試異に結合し、抗腫瘍治療組成物が作られる。このようにして作った、効果量の抗腫瘍治療組成物を、その表質に組織因子を発現する腫瘍細胞を有する被検者に投与することができる。このような腫瘍細胞の代表例は、胸及び肺のがん細胞である。

ここで考案された抗謀痛試策の代表例には**** 1、**** Re、**** BI 及びこれに対するもののような放射性拡積がある。放射性拡積結合モノクローナル抗体治療組成物の製造法及びその使用法は、コザック(Kozak)等(トレンズ・イン・パイオテクノロジー(Trends in Biotech、) 4巻、253~254頁(1986年))により報告されている。

により関始する環集を中和する抗体分子を生度する。さらに、 h u T P h: 因子り/W a の複合体と免疫反応するハイブリドー マ生産抗体は、数抗体の、h u T F h ポリペプチドゥ1-30又 はp 26-49、好をしくはその両方と免疫反応し、かつ、より 好ましくは、技抗体分子が、ポリh u T P h ポリペプチドゥ56 -71とは免疫反応を起こさないことを特徴としている。

望ましい免疫特異性を有する、すなわち、特別なタンパク質をして、またはポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生理する (分泌する) ハイブリドーマの作成注は、当分野ではよく知られている。特に、ニマン (Riman) 等により報告されたハイブリドーマ技術は (プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Pvoc. Ketl. Acad, Sci.) USA、80巻、4949~4953頁(1983年))、有用である。好ましいハイブリドーマを、例13の第5長に示した。

ハイブリドーマ培養物TP8-5G9、TP9-6B4及びTP9-10H10はプタベスト協定に従がい、1987年3月27日ATCCに保管され、各々受理番号、HB9382、HB9381及びHB9388が割当てられた。

1. 治療方法及び組成物

本発明のhuTFh因子VI/VIaの結合部位ポリペプチド類似物、抗体組成物、モノクローナル抗体組成物及び抗凝集MiaAbは各々、生体内において、組織因子による因子VI/VIaの結合を調整するのに用いることができる。

別えば、huTFh因子理/Woの結合部位ポリペプチド類似物は、効果量を被抗者に投与したとき、因子W/Woの組織因子への結合を競争的に限等することができる、医療的に許容しうる組成物に用いることができる。この阻害は、組織因子-因子W/

投与されたボリペプチド又は抗体分子含有超成物は、溶液又は サスペンジョンの形をしているが、ボリペプチドは、錠剤、丸薬、 カプセル、放出持続製剤又は粉末の形もとる。どの場合にも、こ の組成物は、0.10 %~35%、好ましくは、25%~70%の 活性成分を含んでいる。

活性成分としてポリペプチド又は抗体分子を含む治療組成物の 調製は、この分野ではよく知られている。典型的には、このよう な組成物は、液体溶液又はサスペンジョンのような注射可能な形 に調製されるが、注射的の液体溶液又はサスペンジョンを作るの に過している固体形としても調製される。またこの調製物はエマ ルジョン化されることもある。この活性治療成分は、しばしま、 医果的に許容でき、かつ、活性成分に適合する試形剤と混合する。 例えば、真型的試形剤としては、水、食塩水、デキストロース、 グリセロール、エタノール又はそれらに類するもの及びこれらの 組合せたものがある。加えて、もし、望ましいなら、この組成分 は、加湿剤又はエマルジョン化剤、pt模衡剤のような、活性成分 の効果を促進する補助物質を少量含ませることも可能である。

ボリペプチド又は抗体分子組成物は、中和した医療的に受容し うる塩の形に調整することもできる。医療的に受容しうる塩には、 酸付加塩(ボリペプチド又は抗体分子の遊離しているアミノ名で 形成される)及び、例えば、塩酸又はリン酸のような無機酸又は、 酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸及びこれら に頻するもので形成されるものがある。遊離したカルボキシル基 で形成する塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、 カルシウム又は鉄の水酸化物のような無機塩基及びイソプロビル アミン、トリノチルアミン、2~エチルアミノエタノ~ル、ヒス チジン、プロカイン及びこれらに類するもののような有機塩基か ら誘導される。

治療用のポリペプチド又は抗体分子含有組成物に例えば、単位 技与量の住計によるように、局所的に又は静原住計により随便に 対与される。

本発明の治療組成物に対して用いられる"単位投与"という語句は、ヒトに1回投与するのに通した、必要とされる常叙利、すなわち、キャリケー又はピヒクルと共に、望ましい治療効果をあげるために計算された、予め次められた量の活性物質を含む、物理的に分類されている単位を実味する。

被退成物は、投与物形状に適した方法で、治療的に効果的な量が投与される。投与される量は処置される検体、活性成分を利用する検体の血液凝集シスナムの容量及び望ましい組織因子結合能の服客又は中和度に依存する。投与される必要のある活性成分の特定な量は、医師のは断に依存し、かつ、各個人によっても異なる。しかし、適当なポリペプチド投与範囲は、1日に、患者当り、1から5ミリグラムの活性物質というオーダーであり、投与の経緯に依存する。第1回投与及び二次免疫の適正な治療計画もいろいろであるが、典型的には、一次投与後、1時間以上の間隔をおいて、さらに注射又は他の方法による投与が扱り返えされる。別に、血液中、10ナノモル濃度から10マイクロモル濃度を維持するのに十分な、持続的静脈性入性も考案されている。し、診断システム

本発明のキット型の診断システムは、少なくとも1回の検定に 十分な量の、分包は頭として、本発明の発現タンパク質ポリペプ チド、抗体組成物又はモノクローナル抗体組成物を含んでいる。 また、この分包域頭の使用説明書も含まれているのが普遍である。 発動的に、"使用説明書"には、域面過度には、混合する域面

イムノロジー (Scand. J. Januaci.) 8巻、補版7巻、7~23 頁(1978年)、ロッドウェル (Rodwell) 90の、パイオテクノロジー (Biotech.)、3巻、889~854頁(1984年)及び米国特許第4.493,795号参照。

全た、診断シスチ上は、好ましくは分包の、特異的試策を含む。 "特異的結合試策"は、本発明の試策を選択的に結合できる分子 であるが、本発明のタンパク質発現度物、ポリペプチド又は抗体 分子そのものではない。代表的な特異的結合試策は、抗体分子、 補体タンパク質又はその断片、タンパク質人、血液凝集因子はノ ワュ、子ウシ組織因子及びそれに類するものがある。この特異的 結合試策は、反応物が複合体の一部として存在するとき、これと 結合することが変ましい。

好ましい 越機において、特異的結合試選はラベル化される。しかし、その診断システムが、ラベル化されていない特異的結合試 選を含むとき、臭型的には、この試選は、増中手段又は試選として用いられる。これらの版機において、このラベル化した特異的 結合試選は、この増中手段が、反応複合有複合体に結合している とき、この増中手段に特異的に結合することができる。

本発明の診断キットは、血液、血圧又は尿のような体液サンプル中のトゥTFトの存在又は量を検出するのに。イライザ・方式で用いることができる。。イライザ性。は、サンブル中に存在する抗原又は抗体量を検出及び定量するための、固相に結合した抗体又は抗原及び酵素一抗原又は酵素一抗体結合物を用いた、酵素結合免疫吸着検定性のことである。イライザ性の段明は、全て参考としてここに組込まれている、1982年、CA州ロサンゼェルスのラング・メディカル・パブリケーションから出版された、D.P.サイツ(Sites)等の基本的及び臨床的免疫头、第4組、

とサンブルの相対量、試取/サンブル混合物の維持時間、温度、パッファ条件及びそれに領するもののような、少なくとも1回の 検定法のパラメーターを明確に記述してある。

好ましい賠偿において、さらに、本発明の診断システムは、飲 更を含む複合体の形成を知らせるラベル又は指示手段を含んでい 1

ここで用いられているように、種々の文法型の。うべル。及び "指示手段"は、複合体の存在を示す検出可能な信号を座み出す のに直接又は間接的に関連する単一の原子及び分子を意味する。 "生体内"うベル又は指示手段とは、被検者の体内で有用なもの である。どのうべル又は指示手段とは、被検者の体内ではモノノローナル抗体組成物の一部である抗体分子、発現したタンパク質、 又はポリベブチドに結合又は超込まれていることもあるし、また 別々に使用されることもあり、また、これらの原子又は分子は付 加的試験と超合せて、又は早秋で使用されうる。このようなうべ ルは、臨床的診断化学においては、よく知られているものであり、 それらが、他の新しいタンパク質、方法、そして、又はシステム とともに使用されるときに関り、本発明の一部を持成する。

ラベルの結合、すなわち、ポリペプチド及びタンパク質のラベル化は、当分野ではよく知られている。例えば、ハイブリドーマによって生産される抗体分子は、培養培地中の成分として与えられたとき、放射性同位元素合有アミノ版の代謝的取込みによるラベル化が可能である。例えば、ガルフレ(Gallre)等の、メソッ・ズ・イン・エンザイモロジー(Neth、Enzysol.) 73 巻、3~46頁(1981年)) 分別。活性化官能基を介するタンパク質の結合又はカップリング技術は特に有用である。例えば、オーラメアス(Auranean)等の、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・

第22章及び米国特許第3,654,090号、第3,850,752号及び第 4,016,043号に報告されている。

このように、好ましい結構において、本発明の発現したタンパク質、ポリペプチド又は抗体は固相マトリックスに固定され、この公断システム中に、分包されている固体サポートを形作っている。

典型的に、この試棄の固体マトリックスの固定は、他の固定法 もあるが、この分野でよく知られている水性媒体からの吸着が用いられている。

有用な固体マトリックスは、当分野でよく知られている。このような物質には、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社(NJ州、ピスカタウェイ)から、セファデックスという登録 阿根で市販されている、架橋デキストラン;アガロース;1 L州、北シカゴ、アポット・ラボラトリーズ社から市販されている直径約1ミクロンへ約5ミリメートルのポリスチレンピーズ;シート状、ヒモ状又はへラ状のポリ塩化ビニルポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロース又はナイロンベースの概物、又は、ポリスチレン又はポリ塩化ビニルでできているチューブ、ブレート又はマイクロブレートのウェルが含まれる。

ここで述べられているは断システムの状策、ラベル化結合状策 又は、増中状策は、液体分散物として溶液として、又は、例えば、 液結乾燥型のような、実質的に乾燥粉として提供される。指示手 段が酵素である場合、この酵素蒸費も、システムの別の包むに提 供される。先に述べた、マイクロプレートのような固体サポート 及び1つ以上のパッファも、この診断検定システム中に別にパッ ケージされた要素として含まれている。

必断システムに関連して、ここで領籍されているパッケージは、

診断システムにおいて適常使われるものである。このようなバッケージには、ガラス及びプラスチック製の(例えば、ポリエテレン、ポリプロピレン及びポリカーポネート)ポトル、パイアル、プラステック及びプラステックホイルでラミネートした外袋物及びこれらに類するものが含まれている。

n. 給疗法

本発列は、本発列の抗体又はモノクローナル抗体組成物中に含まれている、発現されたタンパク質、ポリペプチド又は抗体分子を含む複合体を生度することにより h n T F h を検出する方法を考案した。 当業者には、これらの複合体を形成するのに利用できる多くの、よく知られている配床的は断の化学手段があることが理解できよう。 従って、典型的検定方法がここで説明されているが、これは、本発明を制限するものではない。

1. 血柱妆出

被検者中に存在する血栓検出法が考案された。生体内での指示 手段と結合する抗体を含む本発明の、効果的量のモノクローナル 抗体組成物を、被検者に静脈注射する。好ましい旋模において、 ラベル化した抗体は、 h u T F h 及び第1表及び第2表のポリペ プチドと免疫反応するが p 2 0 4 ~ 2 2 6 とは反応しないもので、 好ましくはハイブリドーマT F 8 ~ 5 G 9、T F 9 ~ 6 B 4 又は T F 9 ~ 1 0 H 1 0 から生産されたものである。

それから被検者を、ラベル化した抗体分子が、血性の一部に存在するhuTFhと反応し、複合体を作るのに十分な決められた時間、及び、好ましくは、未反応の抗体分子が体内から一掃されるのに十分な付加的時間維持する。その後、被検者を、生成した複合体の存否及び好ましくはその位置について検定する。

2.写体サンブル中のカロTFhの検出

ートした。

その後、残智語組織固体を各々、その固体をヘプタン: プタノール (2:1) 25ミリリットル (a:) 当り、組織関体1 gの割で、ヘプタン: プタノール (2:1) と混合することによって行う5回の抽出を行ない、ついて減過により、その固体を回収する。最後の減過後、残智語組織団体を再び大気圧下、約20 で一乗で乾燥し、脱路語組織粉末を作り、必要になるまで、-80でに保存する。

つづいて、福組機粉末 2 5 グラムをTS/EDTAパッファ (100 ミリモル海宮 (mM) NaC & 、50 mMトリス・塩酸 (せ7.5)、0.0 2 % アジ化ナトリウム、5 mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、0.1 % (V/V) トリトンX-100 (ポリアリルエチレン-9-オクチルフェニルエーテル)) 500 mg と に合し、ついで 4 でで一晩 獲 作する。さらにこの混合物を15,300×gで1時間達心する。生じたベレットを500 mg のパッファA (100 mM NaC & 、50 mM トリス・塩酸 (pB 7.5)、0.02 % アジ化ナトリウム、2 % トリトンX-100) に 再整渦し、スラリーを作る。 蛮盗で1時間の 使 徐 & このスラリーを上述のように 遠心する。生じた上滑を回収し、 液結乾燥した後、100 mg のパッファ A に おかして、 hu TF h 含 有 福 拍出 将 液 を作る。

2. huTPの森血活性を測定するための葡萄検定法

A α T F プロコアグラント活性を、 \$ 7 ℃に複粋した、全域策及び混合物を用いて行う、 1 股階級集技定法で規定した。血無と同容積の、 2 0 m M クエン酸ナトリウム 2 水和物及び 1 4 0 m M MaC & (p87.4) を含む溶液を混合することにより、正常なヒト血球をクエン酸化した。 T B S / B S A 溶液 (150 m M Pac & 、

身体サンプル、好ましくは体級サンプル中のカロ丁Fトの存在、及び好ましくはその量を検出するため、競合的又は非競合的な、健々の不均一及び均一検定性が利用できる。例えば、液体体徴サンプルと、ラベル化したp26-49を、マイクロブレートのウェルの内壁に固定した、ハイブリドーマ丁F8-5G9又は丁P9-10月10から生産された抗体分子を含む固体サポートと混合し、固複相免疫反応混合物を作る。この混合物をサンプル中に存在するカロ丁Fト及びラベル化したp26-49が、固体サポートとして存在する抗体分子への結合を競争し、固相免疫反応患物を形成するのに十分な時間、生物学的検定条件下に健静する。未結合のラベル化p26-49を表疫反応虚物から取り除く。その後、免疫反応废物として結合したラベル化p26-49の量を例定し、その差により、カロTFトの存在を検定できる。例

次に示す例は、本発明の説明を意図したもので、これを製造するものではない。

1.組織因子合有ヒト屋抽出物の講顧

生枝で得られた正常なヒトの脳を12時間以内に処理するかもしくは、-80でに保存する。その強膜及び大脳を除き、ついて 残存する脳部分を、ポリトロンホモジナイザー (NY、ウェスト パリー、ブリンクマン、インスツラメント社)を用いて、等容量 の冷(0で)アセトン中でホモジネートした。このホモジネート したものをさらに3倍容の冷アセトンと混合し、その超機固体 分を、焼結ガラスロートを用いて減過して回収した。各々7回の 2倍容の冷アセトンとの混合及び引きつづく減過により、残留す 体からアセトン可得性物質を抽出した。最後の減過の後、残存す るアセトンを、20で、一晩、残留固体から大気圧下でエバボレ

50mMトリス・8C & (p87.5)、0.1%子ウシ血管アルブミン)で希釈したトロTFを含むサンプル100マイクロリットルを、100μ&のクエン酸化血族と混合した。25mMCaC & 特徴100μ&を混合し、凝集反応混合物を作り、凝集が始まるまでゆっくりと揺らした。CaC & 。 添加と、森血形成の間の時間を倒定した。それから、トロTF活性の標準曲線を、砂で示した凝集時間と希釈率をプロットすることにより作った。代表的標準曲線を築3回に示した。

3. huTPの観和性単難のための、因子で含有団体サポートの 銀髪

ヒトの因子 W / W a を参考文献として組込まれている、フェア (Pair) の報告 (ブラッド (B)ood)、62 巻、784~91 頁 (1983年)) に従って早難した。この早難した因子 W / W a を、アガロース固体マトリックスに結合するため、4 でで一晩、その5 ミリグラム (ng) を、0.1 M 2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸 (M E S) (pH 6.5) に対して透析した。塩化カルシウムを最終漢度 1 = M となるように添加した。それから因子 「 W a を 4 m g の アファゲルー 15 活性化 アガロースピーズ (C A 州、リッチモンド、バイオラド・ラボラトリーズ社) と混合し、生じた結合反応遺合物を、製造業者が推薦するもの (バイオラド) に従って 4 で、4 時間の回転処理を行った。

固体サポート上の通刺タンパク質結合部位を、その固体サポートを、0.1 Mグリシンエチルエステル中、室溝で1時間模押することにより、ブロックした。その後、この固体サポートを、焼結ガラスロート上各約20m2の(I)パッファA、(2)1 M NaC & 合有パッファA、(3)5 m M E D T A 含有パッファ A 及び(4)1 m M CaC & ま 含有パッファ A をこの順序で用いて挟巻した。それか

ら過剰の根件を残圧下で除き、半乾燥状の粒子物質(ケーキ)を 作った。

4.h u T P の因子ほ/VI 規和性による単態

0.1 Mのグリシンエチルエステル及び 0.1 M MES(pH 6.5) を含む 2 0 m 8 の得液を、 2 2 5 m 8 のアフィゲルー 1 5 アガロースピーズ (バイオラド) と混合し、結合反応混合物を作る。この 結合反応混合物を窒温に 1 時間維持する。この生成した結合物を、 焼結ガラスロート上、 1 0 倍容のパッファ 1 を用い、核圧下で値 過することにより洗浄し、グリシンエチルエステルーアガロース ケーキを作る。

例1で掲載した30m4の脳抽出溶液を、1mM塩化カルシウムを含む6リットルのパッファ人に対し、4で、1 残透折を行う。 透析した脳抽出物を、グリシンエチルエステルーアガロースケーキと混合し、固被相反応混合物を作る。回転しながら室温で2時間維持した後、この固流相を規格ガラスロートを用いて減過することで分割する。この後相を回収し、最終温度m2 5 り10ユニットとなるようにトラシロール(MOH、セントルイス、シグマケミカル社、アプロチェン)と混合する。この回収した液相を例3で調製した因子吸/領ェ/アガロースケーキと混合し、第2の固/液相混合物を作る。

この混合物を回転しながら、一晩4でに維持し、トロTF-因子でプリリュ合有固相産物を形成させる。その後、この固相及び被相を先に述べたように該選により分離する。 焼結ガラスロート上に残留物する固相を1mM塩化カルシウムを含むパッファム25mAで洗浄した。さらに、この固相を焼結ガラスクロマトグラフィーカラム (0.5×15cm、パイオラド) に移し、6mAの同洗浄パッファで洗浄した。上記の洗浄油、この固なサポートに試合

このようにして作った透析物をつづいて、4倍容の布アセトンと流合し、huTFタンパク質を比較した。この社成をおよそー10で、5000×8、30分間の遠心で無めた。生成したペレットを登業雰囲気下で乾燥した。典型的な収量は、脱離した脳退機物末1グラム(乾燥重量)当り、2μ8のhuTPであった。

このようにして生じた早離トロTドサンブルをTBS/トリトン中に思慮し、ついで、製造業者の指示に従がい(1し、ロックフォード、ピアス・ケミカル社)、ロードゲンを用い、Na ***1でうべル化した(1し州、アーリントンハイツ、アマーシャム社、マイクログラム当り16マイクロキューリ)。 ラベル化後、通刺の未反応***1をTBS/トリトンを用いたセファデックスG25(NJ。ピスカタウィイ、ファルマシア社)での改塩クロマトグラフィーにより、ラベル化したトロTドから分離した。

*** 1 ラベル化 A u TF 含有サンブルのラウリル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気体動による(SDS-PAGE)評価は、レムリ(Lasmali)(ネイチャー(Wature)、 2 2 7 他、6 8 0 ~ 6 8 5 頁(1 9 7 0 年))の方法に従った。還元条件下で評価するサンブルに対しては、1 0 0 mMのジチオスレイトールを、サンブルバッファ中に含有させた。1 %トリトンX-100、5 0 mMトリス塩酸(pH 7.4)、1 5 0 mM NaC & 中の*** I

AuTPを、10分の1容のTP8-5G9又はPAb100 (ATCC-TIB115;ここで本がティブコントロールとして用いられているSV40ラーツT抗原特異的抗体を生産するハイブリドーマ)ハイブリドーマ特長上滑とともに、4でで1晩インキュペートすることにより免疫性配化を行った。アガロースピーズ(MO州、セントルイス、シグマ・ケミカル社)上に固定したヤギの抗マウスIgGを、その 第1次免疫反応度物を吸収するのに用いた。このビーズを同バッファでよく洗浄し、結合した
*** 1 - huTPを、DTT存在下又は非存在下、同バッファ中で5分間煮沸することにより溶出した。SDS-PAGE後、タンパク質パンドはオートフルオログラフィーで可摂化した。

単離した h u TFを放射性ロク素化し、DTTで違元し、ついて10%アクリルアミドゲルでSDS-PAGE分析したとき、47kダルトンの見かけの分子量をもつ単一のメインパンドが観察された(第4図)。しかし、未違元の h u TFを同様に分析した場合は、およそ58及び47kDaの2つのパンドが相対的に等しい量で観察され(第5図レーンB)、このことは、少なくとも2つの異なる多きさのものの存在を示している。

非運元で観察されるこの2つのパンドに対する説明としては、その大きな方、すなわち、決動が遅いパンドは、非常に多くのグリコシル化を受けたものか、付加的なプロセッシングを受けていないタンパク質を有しているのか、又は、付加的な、ジスルフィド結合で結合したポリペプチドと会合しているのかもしれないというものである。運元後の単一パンドの存在は、はじめの2つの示唆と一致している。その後者の可能性は中でも一番大きいように思えるが、その小さいサイズの差のために、付加的ポリペプチド貸は、色素の場所又はその付近に決動するような十分小さいも

のらしく、運元後、10%アクリルアミドでは分離されないので あろう。15%のポリアクリルアミドゲルの復元及び非還元heTP の電気泳動は、単一の分離した軽額を示すのには失敗したが、い くつかの少量の、速く泳動するパンドが観察された(第5図、レ ·一ンA及びB)。これもの小さい、少量のポリペプチドは、以前 に報告されているように(ブローズ (Broze)) 学、ジャーナル・ オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、260 港:10317~20頁(1985年)及びグハ (Guha) 等、ブ ロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエ ンス (Proc. Hatl. Acad. Sci.) USA、83巻、299~302 頁(1986年))、汚換物を示している。この可能性を明らか にするため、も7kDa 及び5 8kDa のパンドは非理元ゲルか ら切り出され、その各々を、ジチオスレイトールで運元し、その 各々を、15%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEに かけた(第5回、レーンC及びD)。581Dタンパク質は125 kD径鍼及び47kDe 煮鎖であると分った。47kDa のタンパ ク質を分析したとき、同分子量の重額のみが観察された。このよ うに、阿者は、SDS-PAGEで間接の巣動をもつ重線を保有 していた。

ロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 、260巻: 10917 ~20頁(1985年))により示数されているhuTF重復のダイマーと一致する、少量の90kDm タンパク質も示した。

huTF軽額が怠抜からタンパク質の分解によって生するという可能性を研究するため、SDS-PAGEにより単離した軽額及び重額を、N来端アミノ酸配列分析にかけた。

重額及び軽額をSDS-PAGPで分離し、アパーソールド(Abersold)等の高pH法(ジャーナル・オブ・パイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Ches.)、261巻、4225~4238 質(1986年))を用い、活性化した、アミノ被覆ファイパーガラスフィルター上に電気プロットした。このタンパク質パンドを、蛍光染料(アパーソールド(Abersold)等、上記)により、このプロットを可視化し、切り出し、そして、まだファイパーガラスに結合したまま、PTH誘導体のオン・ラインHPLC分析を用いたアプライド・パイオシステムズ470人タンパク質シークエンサーで配列決定した。別にタンパク質パンドをコマージ・ブルーによる染色によりゲルを可視化し、シークエンシングのために、電気搾出した。両方法とも等しい結果を与えた。

トロ丁ド重複のマイクロシークエンシングは、ほぼ等モル量のアミノ政配列で一致した結果となった。ほとんど全ての場合、各アミノ政務器は2サイクル離れて、2度出現する。これは、長さがN末浦で2残基異なるトロ丁ド賞質の2つのパリアントがねじれたN末端をもつことの羽白な証拠である。大きい方のパリアントのN末端は、非特定のアミノ政Xを含む

Ser-Gly-X-X-Asp-Thr-Val-Ala-Ala-Tyr-X-Leu-Thr-Trp-Lys-ser であることが誘導された。

軽額の配列決定するいくつかの試みは、ブロックされたN宋鴻

と一致して、なんら配列の情報を与えなかった。しかし、hetpの重複及び軽額は、単型されたhuTFに対して生じた、2つのウサギの抗huTF抗血清及び28個の、マウスモノクローナル抗体の全でが、重複のみに結合することが分っていることから、抗康的に全く別のものである。それゆえ、軽額は、重額のタンパク質分解断片とは考えにくい。さらに軽額は、ペーター。3クログロブリンに対する抗血清とは反応しなかった。

現在、12.5kDのAuTF軽値の意味は知られていない。それは、単一の、独立した分子組なので、ランダムなジスルフィド
交換による、単離の際にアーティファクトとして誘導されたものでもないようだ。遠元なしに、現和性による単型を行ったhutfをSDS-PAGEにかけたとき、huTF活性は、58kDoと47kDoの分子量に対応するゲルから辞出した。これら2つの分子量に対応するhuTF活性も、想脳又は部分的に単層した胎型の抽出物を、SDSゲルの電気泳動にかけたとき(データ示さず)も検出された。全ての場合において、その活性は、因子では存す、このことは、huTF特異的活性を示している。これらの知見は、huTFのみが因子はを活性化でき、かつ、軽値はこの類能に必要ないことを示している。

軽額がトロTF重額のおよそ半分のみにジスルフィド結合していることは興味深い。生体内で、トロTFの重要な領域に不在なのか、存在するのかとは別に、昇面活性利で分解される、非共有的相互作用を介して金合しているのであろう。軽額は、サイズが小さく、SDSーPAGEの際にマーカー色素の部分に決動してしまうため、また、トロTFの報告されている分析例が運元後行なわれていることから、初期の研究では気づかれなかった。現行の観和性を用いた方法で単離することができる制限された量では、

タンパク質染色によって、会合した小ポリペプチド鎖を検出する ことは困難である。

イン・ビトロでは、単量体トロTFが凝集を開始するにもかかわらず、トロTPによる凝集の生理的開始は、細胞表面で起こる。 軽額は、直接的凝集検定性で検出することができる、トロTF機能又は機構において重要な役割をはたしていることが推察できるであろう。例えば、軽額は、因子リノロコの組織因子への結合の正の議詞性を説明すると仮定されてきている、因子以に対する2つのサブユニットレセプターのアッセンブリーに関与している可能性がある。別に、細胞表面上の構造ドメインでのトロTFの機構及び、細胞表面上でのトロTF活性の制御は、トロTF軽減に仲介されるのかもしれない。

N結合オリゴ糖の役割は、*** 1 ー h u T F サンブルの脱ゲルコシル化により試験した。 無分およそ3.6 × 10 * カウントを含む、ラベル化 h u T F 約 1 2 7 4 ナノグラムを 0.4 ユニットのグリコペプチダーゼ F (1 N 州、インディアナボリス、ベーリンガー、マンハイム・パイオケミカルス社)、 20 m M トリス塩酸(p H 7.5)、 10 m M ED T A、及び 1 % トリトン×-100を含む 20 μ 2 の 溶液と混合し、 37 でに 16 時間維持した。 それから、この 脱グリコシル化した 医物を、 先に述べた S D S ー P A G E で 分析した。

第7図、レーン4及び5に示した、放グリコシル化の研究結果 は、58kDaのAuTPは、別のタンパク質部分、すなわち軽 額の存在のため、47kDaのものよりも、高い相対分子量を示 すことを表わしている。

このようにして早難した A u T P を、再設質化し、そのプロコアグラント活性が再換成された。 最高の活性を有する再監質化組

成因子重物を提供するのに必要な組織因子: 陰質比が、0.1 %BSAを含むHBSパッファ溶液(2.0 mMへペス、 pH 6.0、14.0 mM No C 2、0.0 1 % アジ化ナトリウム)中、種々の復度となるように、上述の得られた単離 b ロTFを溶かすことにより実験的に測定された。それから、種々 b u TF希取物を以下に述べるように再辟質化し、さらに、例2で報告されている軽無検定法で測定された、最も高い活性を示す比が、後の使用のために認慮された。

ト u T F の再賠質化のための賠責は、M O 州、セントルイス、シグマケミカル社から入手できるウサギの届下セトン抽出粉末から抽出することにより調整した。この粉末を、粉末1 g に対し、25 o g のヘブタン:ブタノール(2:1、 v / v)の割でヘアタン:ブタノールと混合し、ついでこれに含まれる固体を挽精ガラスロートを用いた濾過により回収した。残留固体について、この抽出を6回くり返した。さらに、この残留団体モロト・エバボレーションで乾燥し、クロロホルムに溶解後、-80でに保存した。必要なときに、そのクロロホルムに溶解した固体を資素雰囲気下で乾燥し、新しく個製した0.25%のデオキシコール酸ナトリウム溶液中、4 s g / s g となるように溶解し、ウサギ指リン段資溶液(P B P L)を作った。

再勝貫化には、各huTFפ級物 I 0 0 μ ℓ を、1 0 0 μ ℓ の R B P L 溶液、0.7 6 μ ℓ の 1 % ウシ血液 アルブミンモ含む H B S 溶液 (H B S / B S A) 及び 4 0 μ ℓ の 1 0 0 μ Μ 塩化カドミウムと混合する。この混合物を 2 時間、3 7 τに維持し、ついて、ここに含まれる h α TF 活性を、例 2 で述べた 最無検定法で測定した。

5. ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体の作成

全てのハイブリドーマは、6~8週間の年令の、スクリアス・ クリニック・アンド・リーサーチ・インスチチュート、動物飼育 場から入手できるメスのBalb/cマウス由来の脾尿初胞を用いて作 成された。

a. マウスTF8の免疫化

例4で調製した現和性単離化 h u TF.5 マイクログラムを100 ロミノ=&となるよう生理 女塩水に溶かし、MOHハミルトンのリビ・イムノケム・リラーチ社から入手したR-700 アジュバントと1:1の割合で混ぜ:エマルジョン化した。ついて、このエマルジョンをマウスTP8に皮下注射した。

このマウスTF8は同様に、約2週間後、変性 h u T F 及びR-700 アジュバントを含むエマルジョンの後種を受けた。変性 h u T F は、0.09 メトリトンメー100、0.83 メS D S、0.2 M - 2 - メルカプトエタノール及び 2 70 μ g / m g h u T H を含む T B S (150 m CaC 4 m、50 m M トリスー H C g (p H 7.5) を、5分間 意味して調要した。その後、この変性した h u T F を、等容量の、0.6 m g / m g セウス 血清 T ルプミンを含む生理 女塚水と混合した。つづいて、4 倍容の T セトンを含む生理 女塚水と混合した。つづいて、4 倍容の T セトンを含む生理 女塚水と混合した。つづいて、4 倍容の T セトンを含む生理 女塚水と混合した。つづいて、4 倍容の T セトン・ に保った。生じた は 取を約1300 × g、10分間の 遠心で 類り、4:1 (マ / マ) の T セトン・水で一度 洗浄してから、0.1 m g / m g の 機度となるよう、200 μ g の 生理 女 塩 次 で 必需 した。

最初の注射から、約4週間後、0.1mg生理食塩水中33μgの現和性単離化カロTFを、0.1mgの完全フロイント・アジェパント (cPA) と混合し、エマルジョンを作り、これをマウスTF8に腹腔内性射をした。

最初の接種から8週間後、リン酸製街食塩水中15μgの観和

ム・パイオケミカルズ)をイムロン・36穴フレキシブル・ピニルマイクロプレートのウェルに入れた。それからこのプレートを、1時間、37℃を維持し、「&Gをウェルの型に吸着させた。 TBSで3回統後した後、3%オパルミンを含む100g8の TBSントリトンを各ウェルに入れ、透剌のタンパク質結合部位

ウェルを、1時間、約20℃に競技したのち、そのプロッキング溶液を、アスピレータで除いた。そして、各ウェルに50μgのハイブリドーマ培養上滑を加えた。できた固被相免疫反応混合物を1時間、37℃に競技した。その後ウェルをTBSで3回洗冷し、過剰の液は、アスピレータで除いた。

例4で複製した、TBS/トリトン中、およそ1mgのカuTFと、およそ5×10°cpmを合む、50pgの1mg1ラベル化カuTFを各ウェルに入れ、第2の固液相免疫反応混合物を作った。そのウェルをTBS/トリトンで3回洗浄し、固相に結合した '**1-huTF含有免疫反応感動を単離した。過剰の嵌件はアスピレータで除き、ウェルを乾燥させた。個々のウェルを切り離し、各ウェルに含まれる'**1を、ガンマカウンタで計較した。

バックグランド放射器性(huTFと抗体の反応無しの場合)はウェル当り、平均約200~300cpmであったが、一方、huTFと抗体の反応が有る場合は、ウェル当り1000cpmのカウントがある。抗huTF抗体の生度が正と検定されたハイブリドーマを退択し、本発明のハイブリドーマとした。つづいて、これらのハイブリドーマを、以下に述べるドット・ブロット検定でスクリーニングした。

b. ドット・ブロット・イライザ法

をブロックした。

例 4 で調製した、アセトン比較したhuTFを、4 : 1 (v/v)

性単離化トロTFを静原注射(1. v.)し、関じトロTP/ PBS接種を2(時間数にも行った。そのマウスTF8の卵細胞 を融合のため3日後に採取した。

Ъ. マウスTF9の免疫化

マウスTP9は、2回のリビ・アジェベント注射に、エマルジョン化前に変性したトロTFを用いること以外は、マウスTP8と同じ接種スケジュールがほどこされた。さらに、第1回目のPBS接種の頭腔内注射をCFA合有接種後4ケ月半後に行なった。

c. ハイブリドーマの作成

TF8及びTP9由来の評認能に、同じ融合操作を行った。各マウス由来の評細胞約 $1 \times 10^\circ$ 値を、30% がリエチレングルコール (PEG4000、ATCC25322-68-3) を含む 200 の 20 の 20

同マウスTF8及びTF9弾和助由来の配合体共、HAT配合 媒体耐性ハイブリドーマ和助クローンを生じた。TF8融合体は 907個のHAT耐性ハイブリドーマを、一方TF8融合体は、 348個のHAT耐性ハイブリドーマを生じた。

- 6. 抗ねせ丁ド抗体分子の生産によるハイブリドーマのスクリーニング
- a、面相RJA

TBS中、20x1/m18に給収した100x1のヤギ試マウス1gG (1NH、インデアナポリス、ペーリンガー・マンハイ

のアセトン:水容液で抽出した。残存する状況をTBS中に20 PBブッルとなるように整備した。このAuTF溶液20pB (1pg) を、情えないインクで、BA83ニトロセルロース紙 (シェレイチャー・アンド・シュエル、NH州、キーン)上に書いた数字の頃にスポットする。スポットしたAuTFを空気乾燥 し、個々のスポットをパンチを用いて、ディスクに切り出す。僧 々のディスクを、BLOTTO(ジョンソン(Johnson)等、ジェ ネッティック・アナリティカル・テクニック(Gese、Anal. Tech.) 1巻、3頁(1984年))を含む、多次トレイの個々のウェル に浸し、約1時間、37℃に維持した。

このBLOTTOを、ウェルからアスピレータで散き、各ウェルに、200μεのハイブリドーマ培養上清を加えた。さらにこのウェルを2時間、37でに保ち、その後、このペーパーディスクを、TBSで2回洗浄し、ウェルから取り出し、TBSにより、さらに洗浄するため、1つの大きな容器に入れた。ついで、過剰の液体をその容器から除去する。

プロトブロット試頭キットの(MI州、アン・アーパー、プロメガバイオテク社)アルカリホスファターゼ結合抗マウス I e G を、BLOTTOで 5 7 0 0 倍に粉収し、このペーパーディスクと接触させた。このプロトブロット溶液との接触を、3 7 で3 0 分間保った。その後、ペーパーディスクを、TBS中で3 回洗浄した。乗者の指示に従い、プロトブロットキット中に含まれている発色物質により、ディスク上に結合したアルカリホスファターゼが検出される。

c. ウェスタン・プロット検定法

ウェスタン・ブロット検定のため、例 4 で報告したように単類 した約 1 0 p s の h u T F をサンブルパッファ (2 M S D S 、

符表平1-503438 (20)

5 0mMジチオスレイトール、10%グリセリン)に将かし、5 分間、煮沸した。それから、これを、レムり (Laemali)により軽 告された(ネイチャー (Matore) 、226巻、680頁 (1970 年〉〉、参考としてここに超込まれている、予め数色された分子 量征率の小さい両側のレーンの間の広いレーンに試料をロードす る、分取型のスラブゲルを用いたSDS-ポリアクリルフミドゲ ル電気泳動にかけた(分子量複単:MA州、ニュートシセンター、 ディパーシファアイド・パイオテク社)。 参考としてここに組込 まれている、トウビン(Towbin)等(プロシーディング・イン・ナ ショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Fatl、Acad、 Sic.) USA, 7 6 他、 4 3 5 0 頁(1 9 7 9))により報告されて いるように、電気泳動及びニトロセルロースへの電気ブロッティ ング後、このブロットを、TBS中の5%放駐粉乳溶液でプロッ クレ、マニホルドに固定した(MA州、ケンブリッジ、イムネチ クス社、ミニブロッタ)。8個のハイブリアーマ紹和培養上液の ストックを、各マニホルドスロットにロードし、37セで1時間 インキュペートした後、このブロットを取り除き、TBSで洗浄 した(0.0 2%アジ化ナトリウム合有TBS)。抗体が結合した レーンを、発色物質で発色させたアルカリネスファターゼを結合 した第2抗体を用い、供給業者の推める方法に従って可視化した (W1州、マジソン、プロメガバオテク、プロトブロット)。降 性のストック由来の培養上清を、5%放脂物乳TBSによる8倍 希釈物について、別個に再テストし、抗工F抗体を生産する個々 のハイブリドーマクローンの同定を行った。

抗トロTF抗体定生が正と判断されたハイブリドーマをさらに 特徴づけるために選択した。例えば、上記のTF8融合体由来の ハイブリドーマは、例6トで述べられているドット・ブロット検

5 C 9 モノクローナル抗体 1 0 mgの透析により、法性化した、活性化したTF 8 - 5 C 9 を、2 mgのアフィゲルー 1 0 アガロースピーズ (バイオラド) と混合し、できたカップリング反応混合物を、製造業者の指示に従がい処理して、TF 8 - 5 G 9 / アガロース団体サポートを作った。

それから、例3で報告したように、固体サポート上の過剰のタンパク質結合部位をプロックし、洗浄後、減圧維速して、TP8-5G9/アガロースケーキを作った。

S. huTPの免疫級和性による単語

ヒトの疑のおよそ半分、すなわち約100mmに等しい、例1で掲載した脳抽出存後を、計68のパッファAに対し、2回の外放交換をしつつ、4でで3日間透析した。その透析した拍出物を1.5時間、10.000×gで速心した。できた上清を、例4で調製したグリシンエチルエステルーアがロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら、2時間変温に維持したのち、その固相と被相を流結ガラスロートによる速過で分離した。そのカuTF含有液相を回収し、例8で調製したTF8-5C9/アがロースケーキと混合し、図/液和免疫反応混合物を作った。

この免疫反応復合物を、回転しながら一晩、4 でに保ち、組織 因子含有固相免疫反応度物を形成させた。それから、この固相及 び被相を先に述べたように健遇で分離した。固相が残留し、これ を10倍容のパッファムで洗浄した。その後、固相をガラスクロ マトグラフィーカラムに移し、順次、001 %トリトンX-100 を含む2倍容の1 M NoC &、及び201 %トリトンX-100を 含む2倍容の0.1 Mグリシン(pH 4.0)で洗った。

上述の洗浄後、その固体サポートに免疫学的に結合している ね u T F 、その固体サポートを、焼結ガラスロート上に保持した 定位及び例6 c で述べられているウェスタンプロット決定法で れ u T F との免疫反応を、そのハイブリドーマ培養上情が示す ならば、抗huff抗体 座生ハイブリドーマ培養と特徴づけられる。これらの特徴は、24個のT F 9 ハイブリドーマ細胞系列について みられ、そのほとんどは、例13の第5表に示した。その他のスクリーニング法で選択したハイブリドーマにより 歴生される抗体 分子は (1) 即毎 助を独自の融合体に提供する免疫化マウス (すなわち T F 8 又はT F 9)、及び、独特のHAT培地耐性ハイブリドーマ細胞が単離される。96 六培姜プレート、乳毒号及びウェル 番号を示す文字によって呼ばれる(すなわち、5日7、11日12、その他)。特殊な意味の文字は、1語、ハイフン結又はローナル抗体分子組成を意味している;TF8-5G9、TF8-5G9及びT F8-5G9。

7. イムノグロブリンIgGの単粒

イムノグロブリンIEGは、製造業者の指示に従がい、パイオラドラボラトリーズMAPSIシステムを用い、マウスのハイブリドーマ細胞系列TF8-5G9 (ATCC第HB9382号)を含むマウスの腹水液から単離される。単離しだIEGのタンパク質速度は、製造集者の説明書に従がい、BCAタンパク質検定は取(ピアスケミカル社)を用いて測定した。

ねて下の免疫観和性による単離のための、抗ねってア合有 面体サポートの顕聲

抗れるTP抗体を、アガロース固体マトリックスへカップリングするため、少なくとも1回透析根交換を行う、0.1M MES、pH6.5を含む500mmの透析パッファに対する、4で、16時間の、例7で報告したように調製した、MAPS単態TP8-

まま、Q1Mグリシン、pH25及び1%トリトンX-100溶液20m4で洗浄することにより、開放 (溶出) した。それから、例4に会て透べたように、溶出物質を回収し、huTP検定を行ない、集めて透析した。

透析物を4倍容の冷アセトンと混合し、AuTPタンパク質を 沈殿化した。さらにこの沈殿をおよそ-10で、5,000×g、 30分の違心で無めた。生成したペレットを重素雰囲気下で乾燥 し、そのペレットの一部を変性条件でのSDS-ポリアクリルア ミドゲル電気泳動で分析した(SDS-РAGE)。

第8図に示したこの分析結果は、huTFが免疫程和性により、 設設指粉末1グラム当り、 5 3 mgの huTFの収率で単型される ことを示している。

10. 抗huTF抗体による磁集の阻害

10 p g のハイブリドーマ培養上津を、例4で調型した約2 pg の英語質化 h u T F を含む 9 0 p g の H B S N B S A と混合した。このようにして作った免疫反応混合物を 3 0 分間 3 7 t に保ち、抗 h u T F 抗体分子を免疫学的に h u T F に結合させ、免疫反応度物を形成させた。つづいて、この免疫反応混合物について、例2 で派べたように、 h u T F のプロコアグラント 活性を検定した。ネガティブ・コントロールとして、無関係の 1 g C 個質物を抗 h u T F 抗体の代りに用いた。

効果的カロTF 濃度は、インヒビターの存在下測定した豪血時間を用い、例2のように作った損弊曲線から外挿した。阳客は、用いた実際のカロTF 温度について、効果的カロTF 温度の比率として満わされる。少なくとも50パーセントの阻容をするモノクローナル抗体分子類製物は、本発明の抗体分子成分を中和するものとして選択された。

例5に述べたように、単越したAuTFに対して生じたハイブリドーマ由来の数多い均乗上済を、凝集開始を阻害する能力について、先の操作により測定した。有意に凝集を阻害することが分ったハイブリドーマを、第5度に示した。

第 6 丧

抗カロTFによるカロTF-因子を依存の改集題客 1、クエン酸化ヒト血器による基準

1. クエン酸化モト皿供による経集

抗	件	因子VI	阻害率
ブラ	ンク・	+	. 0
ТТ	8 5 G 9 ?	+	5 8 %
コン	トロール・	+	0
TF	8 5 G 9	_	8 3 %

複合体により開始する数類を照客する能力を有意にもつと考えた。 これらのM・A bには、TF9-1B8、TF9-5B7、TF 8-5C4、TF8-11D12、及びTF8-21F2がある。 11、ポリペプチド合成

ここで使用されている種々のhuTFh領域に対応するポリペプチドをハゲンメイヤー(Bagenmaler)等(ポップーセイラーズ(Hoppe-Seyler's) 2. フィジオロジカル・ケミストリー、353 巻、1973頁(1982年))のシンメトリカル・アンハイドライド法を用いたアプライド・パイオシステムズモデルも30Aペプチド合成機で化学合成した。第1及び第2要のポリペプチドに加え、以下に示す第3要のポリペプチドも合成し、これには、huTFhと反応できる抗ポリペプチド抗体の生産に有用な、本発明のポリペプチドが含まれている。

第 3 表 抗原性ポリペプチド

12. ポリペプチドによる凝集阻害

huTF依存の凝集開始を疎開する、本発明のポリペプチドの 能力を、まず、このポリペプチドを因子リノリョ及びカルシウム イオン存在下でインキュペーションし、さらにこの混合物を、因 子U/VI=欠損血際に加えて、凝血時間を見種った。

ヒトの因子VI / VI m を例3に述べた方法で単離した。HBS/BSAm # 当り、この単離した因子VI / VI 2 0 0 m m の溶液 1 0 p # に、」00 p # HBS、20 p # 25 mM CoC # m 及び100

. 3. 因子切テプリート化ヒト血性

コントロール

抓 体	因子祖	图客率
ブランク	+	D
T.F 8 5 G 9	+	5 B %
コントュール	+	0

- ブランク・とは、モノクローナル抗体を検定法で用いなかったことを示している。
- b. 「TF85G9°とは、ハイブリドーマTF8-569から 早離したモノクローナル抗体を検定で用いたことを示している。
- c. *コントロール*とは、検定で無関係なモノクローナル抗体 を用いたことを示している。
- 4. ** + * は、抗体を混合物に加える前、因子なを加え、特製した h u T P と複合体を形成させることを示す。

抗りuTF抗体による凝集図客の別の研究が、TFを因子リンリ。と会合させ、TF:因子リンリ。複合体を形成させる前後の図客を比較する条件下で行った。

これらの研究で、予め形成したTF:W/Wa複合体を用いた 抗 h u TF h 抗体による最無国客を、利用するモノクローナル抗 体合有溶液 1 0 m g に M A P S 単離化モノクローナル抗体含有溶 液の代りに、ハイブリドーマ均要上標を用いた以外、例 1 0 で述 べたのと基本的に同様に行った。比較のため、抗 h u T F 抗体に よる凝集国客を、例 1 0 で述べたように、因子 U/Waを含むク エン酸化血法との混合の前、それら抗体及び其脳質化 h u T P の 免疫複合体を形成することにより検定した。

ここで遠べている金での抗体は、この比較服容校定試験を行ったが、約60%以上の限客を示すものだけが、カロアア:W/We

p L の合成ポリペプチド合有TBSノトリトンを加えた。 種々の 海皮で含まれる多種の混合物をこのように調整し、それを、15 分間、37℃に維持した。例4で述べたように調製した再踏質化 した組織因子を、HBS/BSAで類似し、例2で述べたような **聚集校定法でテストしたとき、10ggでおよそ45秒の従集時** 間が得られるように観察した。上記のように無視した現合物をさ らに、再駐賞化huTF10μ & 希釈物、25 mM C a C & a 1 00 □ L 及び I 容の血漿に対し 1. 5 容の H B S で格釈した因子 1/1/10 m 欠撲血漿100×1 (KA州、オーバーランド・パーク、ジョー ジ・キング・パイオメティカル社)と混合した。凝血時間の延長 は、この合成ポリペプチドによる登録の頭裏を示していることに なる。阻害率を、例10で述べているように計算した。少なくと も30%の凝集阻害を示すポリペプチドはカロ丁Ph詰合部位ポ リペプチド類似物、すなわち;第4表のセクション1で示されて いるポリベプチド、p26-49、p146-107及びp161 -189 T & & .

別に、上記随客検定において、モノクローナル抗体による免疫 類和性吸着により、因子リグリッ欠損血器である因子リグリッ欠 損血器を用いた。ヒトの因子リグリッに対するモノクローナル抗 体を、例3で述べたように単離した因子リグリッをわってPの代 がに免疫順として用いた以外、例5で述べたものと基本的に同様 に調散した。できたハイブリドーマを、イライザ柱で評価し、 IN州、サウスペンド、エンザイム・リサーチ・ラボラトリーズ 社から入手できるヒトの血液タンパク質、タンパク質S、因子IX、 因子又及び因子 Bと反応しないハイブリドーマを同定した。その ようなハイブリドーマ、FV 1 1、F1、2 H3 - 3.2 は、f.S. エジントン(Edaington) 博士から歌いた (CA州、ラジョラ・

特表平1-503438 (22)

スクリプス・クリニック・アンド・リサーチ・ファンデーション 社)。イムノグロプリン1gGを、ハイブリドーマFV11、F 1、2 H 3 - 3.2 を含むマウスの酸水から単層し、この単層した 1 gGを、例 8 に述べたように、固体サポートに結合させた。で きた抗因子ほグセョモノクローナル抗体含有固体サポートを貯留 した正常なクエン酸化血性から、血腫含有液相を収穫し、保留す ること以外、例 9 で述べた免疫製和性操作を用いて、因子は/Via を缺くのに用いた。

融質化型で用いたとき、競合的に蓄無を阻害する、いくつかの ボリベプチドの能力を、100m & の合成ポリベプチド溶液の代 りに、100m & の脂質化合成ポリベプチドを用いることにより 上配検定法での評価を行った。

取實化合成ペプチドは、合成ポリペプチドを、単離したbaff の代りに用いること以外は、単離したhuffの再語質化で用い た、例4で述べた方法で掲載した。ルーチンには取習とポリペプ チドの比は52:1 (マ/マ)が用いられた。少なくとも30% の編集図書を起こす語質化ポリペプチドが、距質化型で存在する と含、huff結合部位ポリペプチド類似物すなわち、第4次の セクションIで示されたポリペプチドと考えた。

第 4 表

huTFhのポリペプチド類似物の huTFによる凝集開始の阻害

ペンチト	. 阿.桑	
1. 弁リン暦実化ペ	ブチド	港度
P 1 - 3 0	2 5. 0	10 u M
P 2 6 - 4 9	8 8 8	10 u M
p 4 1 - 7 1	2 5. 0	10 m M

た。

50μ & のハイブリドーマ培養上清を各ウェルに入れ、1時間 37 でに維持した。さらにこのウェルをTBSで3回流浄し、過 刺の液体をアスピレータで除いた。

早期化トロTFは、例3で述べたように、免疫観和性カラムで 調製した。単期化トロTPを含むアセトン性限をTBS/トリト ンに溶かし、そのタンパク質濃度を、製造業者の説明書に従がい、 BCAタンパク質検定は第(ピアス)を用いて測定した。トロ『F の茂化水素側膜を、オシャネシー(0'shanaessy) 等の報告した 方法(イムノロジカル・レターズ(]aspool, Letters)。8巻、 273~227頁(1984年))に従がい、ピオチンーとドラ ジド(NY州、プレインピュー、1CNパイオメディカル社)を 用いて、ピオチン化し、ピオチン化トロTF溶液を作った。

TBS/トリトン中60mg/mgに調製した50μgのビオチン化huTP将液を、5μM合成ポリペプチドとともに、各ウェルに入れ、1時間、37℃に競技した。その後、このウェルをTBS/トリトンで3回洗砂した。

5 mM EDTA、0.5 %トリトンX-100及び1%BSAを含むTBSで1/100に無釈した、100μまのストレプトアビジンー結合アルカリホスファターゼ (NY州、ニューヨーク、エンゾバイオケム社、デテク1-alk)を各ウェルに入れ、30分間、37 にに維持した。その後、このウェルを、10mMリン酸カリウム (pB6.5)、2%BSA、0.5%トリトンX-100、0.5 M塩化ナトリウム及び1mM EDTAを含む溶液を4回洗い、ついで検出バッファ (0.1 Mトリス・塩酸 (pB8.8)、0.1 M HeC&、5 mM HeC&。)で1度洗った。

その後、技出パッファ中、2mMのpーニトロフェニルリン数

		10 36 1 1	000300 (22
	p 4 0 - 4 9	2 5. 0	1 0 u M
	p 5 6 - 7 1	2 5. 0	10 u M
	P 7 2 - 1 0 4	2 5, 0	10 u M
	p 9 4 - 1 2 3	2 0. 0	1 0 m M
	p 1 2 1 - 1 5 5	1 0. 0	1 C = M
	p 1 4 6 - 1 6 7	8 7. 5	10 m M
	p 1 6 1 - 1 8 9	3 2. 5	10 u M
	p 1 9 0 - 2 0 9	2 0. 0	1 0 u M
	p 2 0 4 - 2 2 6	2 0. 0	10 u M
	2 L	0	_
Ð .	リン脂質化ペプチド		•
	P 1 - 3 0	8 1. 0	10 u M
	P 2 6 - 4 0	B 3. 0	10 u M
	p 4 0 - 7 1	6 5. 0	10 u M
	p 5 0 - 7 1	7 3. 3	3 Č u M
	p 9 4 - 1 2 3	9 3. 7	10 u M
	p 1 2 3 - 1 5 5	5 5. 0	10 u M
	p 1 4 6 - 1 6 7	8 0. 0	1 0 v M
	p 1 6 1 - 1 8 9	9 4. 0	1 0 u M
_	F4 + 0 10		

2. 例12で述べたように浏定した阻害率

上記のポリペプチド間等研究で得られた代表的投与 - 広答曲線 を第3及び第10図に示した。

13. ポリペプテドによる抗体~huTF免疫反応の阻害

フレキシブルピニルでできたイムロンU底 9 6 次プレート (ダイナテク社) のウェルを通剰タンパク質結合部位のブロッキングを、37 で 2 0 分間行うこと以外、例6 で述べた方法でヤギ抗マ・ウス 1 g G (ペーリンガーマンハイム社) によりコーティングレ

を含む溶液100×8を各ウェルに加え、1時間37でに維持する。ついで、405ナノメーターでの光学密度を各ウェルについて、パイオ・テク・マイクロブレートリーダー (VT州、ウィノースキ、パイオ・テク・インスツルメント)を用いて測定した。この競合的阻害研究の結果を第5度に示した。

第 5 表

モノクローナル抗体とペプチドの相互作用の表

pl p26 p40 p41 p56 p72 p94 p121 p146 p161 p190 -30 -49 -71 -49 -71 -104 -123 -155 -167 -189 -209 -TFR5G9 TF811012 + 1F85C4 1F821F2 1F91D5 1F92C4 1F92F6 TF95C7 **TF96B4** TF99C3 TF910C2 TF81F1 1F91E7 **TP91BB TF9189 TF94D11** 179564

IF9537

TF9664

TP9TE10 +

TP9BEB + +

TF99B1 + +

TP99B4 + +

TP91DH5 + +

TP91DH5 + +

TP91DH10 + +

- a. 各モノクローナル抗体 (Mab)は、同名のハイブリドーマによ 的度生された。全てのハイブリドーマは例13で述べたように、 ハイブリドーマ培養物上資を用いてスクリーニングした。
- b. これらの抗体は、例10の結果から中和性をもたないと考えた; その他の全ての抗体は、同結果に従がい中和性をもつと考また。

もし、ポリペプテド存在下で得られた吸光度測定値が、ポリペプテド非存在下で与えられた抗体に対して得られた平均値値から 1以上の理準俱差をもつとき、図客が有意に起ったと考えた。 14. 2価値イライザ法による身体サンプルにおけるカロTF検出

血液、血漿、唾液、尿、その他の身体サンブル中のカップドは、 同じカップド分子に同時に結合することができる2つのモノクローナル抗体を用りて検出できる。

イムロン・ポリステレンU底 9 6 大ブレートを、まず、各ウェルに、TBS中10 pg/mgに符取した1gG100 pgを入れ、ついで、ウェルと、1gG溶液との接触を、4 で、一晩維持することにより、ヤギ抗マウス1gG (ベーリンガーマンハイム社)でコートした。そのウェルを、TBSで3回洗浄し、ついで、

がAuTFに同時に結合できる能力をもつ限り、いろいろ変えることができる。例えば、第1抗体として、TF9-6B4を用いたとき、TF9-11D12を、TF9-10H10の代りに、第2の抗体として用いることができる。このように、本発列は、本検定法で同時に結合できる種々の抗体の組合せを考案した。
15. 全プレカuTFDコード配列を含むDNA断片の種類

全プレトロTFコード配列を含むDNA断片を第11回にその 制限地図に示されている、組換えプラスミドpCTF64、pCIF 403及びpCTF314と、この分野でよく知られている操作 を用いて排版することができる。例えば、マニアチス(Manietis) 等、NYM、コールドスプリングハーパー、モレキュラー・ラポ ラトリー、ラポラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニン グ(1983年) 参照。

第11図で示されている組換えDNAプラスミド中に含まれる 挿入断片は、クローニングを可能にする、各来端のBcoR 1 リン カー5 'ーGGAATTCCー3' (MA州、レキシントン、コラボラチ ブリサーチ社)を有している。これらのリンカー配列は、天然の カロTFト DNAコード配列の一部ではないので、第2図に示 されるスクレオチド配列中には存在しない。組換えDNA分子構 接の説明は、関係するトロTFト DNA配列についても明らか なように、BcoR 1 末端を含む損化により生じ、これらの付加的 なリンカー配列を含む断片は、第2図で示したスクレオチド塩器 番号によって示されるだろう。この断片は、その末端にこれら付 加的配列を含むことが理解できよう。

プラスミドpCTF64を、制限エンドスクレアーゼEcoRI及びDramで消化し、第2図で示される、塩香残香1~296番に対応するヌクレオチド配列を含むDNA断片を作った。このよ

各ウェルに、3MBSAを含むTBS/トリトン100μ 4 そ加えた。その後、これらのウェルを1時間、37七に維持してから、TBSで3回統浄し、さらに、過剰の液体をアスピレータで除いた。

第1のハイブリドーマ、TF9-6B6由来の抗huTF抗体 分子合有培養上清100g & を各ウェルに入れ、1時間37でに 維持した。それから、これらのウェルをTBSで3回洗浄し、つ いで過剰の液体を、Tスピレータで除いた。

例9で成製したように、免疫製和性単離し、アセトン状配化 カロTFを、TBS/トリトンに溶した。このカロTF溶液の特 駅物をTBS/トリトンで5μg/mgから0.5mg/mgの範囲 で調製し、特釈液100μgをイムロンプレートのウェルに入れ た。このカロTF結釈液を、第1の抗体と接触させ、1時間37 でに維持した。さらにこの特別物をウェルから除合、ウェルを TBS/トリトンで3回抗律した。過剰の液体をTスピレータで はいた。

抗ねってF抗体を、例1で述べた方法により、第2のハイブリ ドーマでF3-10810の額水からMAPSで準難した。この 抗体溶液のタンパク質を測定し、ついで、例13で述べたように ピオチン化によりラベル化した。

このビオチン化した抗 h o T F 抗体をTBS/トリトンで 6 0 ng/sgに発釈し、この溶液 1 0 0 pg を各ウェルに入れた。 そのウェルを 1 時間、 3 7 でに粒持し、ついてTBS/トリトン で 3 回洗った。

この結合した、ビオチン化抗 h u T F 抗体を、例13で述べた デテク1-aik システムを用いて検出した。この検定法で第1及 び第2の抗体として用いているモノクローナル抗体は、その2つ

うにして作った、802ヌクレオチド塩蒸対 (bp) 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分面により単離し、アルカリホスファターゼを用いた処理により取りン改化した。

プラスミド p C T F 4 0 3 を制限エンドスクレアーゼ E co R 1 で消化し、第2図の残器776~1125番に対応するヌクレオチド配列を含むDNA断片を作った。生成した352bpの断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分面により単難した。

プラスミドpCTF314を、制限エンドヌクレアーゼScoRIで摘化し、生成した647bpの断片をサイズ分画で単縁した。この断片は、第2図の残蓄135~775番の配列に対応するヌクレオチド配列を含んでいる。647bp断片をサイズ分画で単離し、アルカリホスファターゼで脱りン酸化した。

この352 bp断片及び類リン粒化した647 bp断片をT4DNAリガーゼの反応によって複能的に結合(ライゲーション)し、第2図の残益135~1125 音に対応するヌクレオチド配列を有する999 bpの断片を作った。

さらに、この999bp断片を、制限エンドスクレアーゼ Dram で消化し、第2図の残器296と297者の間でこの999bp断 片を切断し、これによって、168bpと831bpの断片が生ずる。さらに関リン酸化した302bpの断片と、831bpの断片を T4DNAリガーゼで機能的に結合し、第2図の1~1125者に対応するスクレオチド配列を含む1125bp断片を作った。

PcoR J で消化して、クローニングプラスミドベクター p U C 8 を級状にした。先に誤製した 1 1 3 3 bp断片と、 EcoR I 消化したベクターをT4DNAリガーゼで線旋的に結合して環状組換えDNA分子 p U C - プレカロTPトを作った。

大路圏RRI株(MD州、ゲイサーズパーグ、ベセスグ・リサ

特表平1-503438(24)

ーチラボラトリーズ)をpUCープレトuTPAでトランスホームし、そしてアンビシリン耐性に基づいて、トランスホーマントを選択した。それから、この選択したトランスホーマントをクローン化し、プレトuTPA構造遺伝子をもつ組換えDNA分子の存在によりスクリーニングした。

プレトロTFト構造達伝子をもつ組換えDNA分子の存在によるスクリーニングは、各選択されたトランスホーマント由来のrDN人をEcoRIで排化することによって行った。生じたEcoRI断片をアガロースゲルでサイズに従って分解した。352 bp、781bp及び2682bpのDN人断片に対応する三つのパンドパターンを示す組換えDN人分子でプレトロTFト構造遺伝子の存在を確めた。上述のEcoRI補化パターンを生するrDN人を有する大陽面RRIトランスホーマントは、本発明の組換えDN人分子を含み、かつ、選択され(回収)された。

相胞外アンカー領域を含むが、カルポキシル末端にトランスメンプレン・アンカー領域を欠く、プレカロTFカコード配列の実質的領域を含み、従って、可容性カロTFカタンパク質をコードするDNA断片を次のように構築した。

プラスミド p C T P 6 4 を制限エンドスクレアーゼ E c o R J で 情化し、第 2 図の 1 ~ 4 8 6 香の残濫に対応するスクレオチド配列を含む D N A 断片を作った。このようにしてきた 4 8 6 b p の 断片を、 アガロースゲルを用いたサイズ分画で単離し、その後、 アルカリホスファターゼ処理で限りン酸化した。つぎに、このように減リン酸化した 4 8 6 b p の 断片を制限エンドスクレアーゼ Dra I を用いて情化し、第 2 図の 2 9 6 巻と 2 9 7 巻の間の部位で、 4.8 6 b p 断片を切断し、 2 9 6 b p 及び 1 3 0 b p の 断片とした。この 2 9 6 b p の 断片を アガロースゲルのサイズ分画で 早難した。

(1983年)) の方法に従がい、互いにオリゴスクレオチドが 複雑的に結合するのを防ぐため、ポリスクレオチドキナーゼによ カリン酸化を行なわれなかったこと以外は関機にして、

- 5 ' AATTTAGAGAATAAGAATTCEGE 3 '
- 3 ATCTCTTATTCTTAAGCCC 5 '

の配列をもつ、合成オリゴヌクレオチドアダアター断片を作った。このオリゴヌクレオチドをアニールし、粘着 Eco R 1 来端を含む二本賃 D N A リンカー断片を作り、ローザースタイン(Rother-stein)の方法(メソッズ・イン・エンザイモロジー(Botheda in Enzymoi.)、6 8 巻、9 8 頁(1979年))に従って、平滑末端とした。つぎに、このリンカー断片を、p U C ープレb ・ T F h ー T から得た 7 7 5 bp 断片に製造的に結合し、7 7 5 bp 断片の各末端に1つのアニール断片を含む817bp 断片を作った。その後、この817bp 断片をEco R 1 で清化し、817bp 断片とした。この805bp 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で単離した。

クローニングプラスミドベクターpUCI8をBcoRlで消化 し級状化した。先に頻製した805bp断片とEcoRl消化したベクターをT4DNAリガーゼを用いて機能的に結合し、環状組換えDNA分子pUCープレカuTFh-TRとした。

大場留RRIをpUCープレねuTFねーTRでトランスホームし、pUC-プレカuTFねーTRを含むクローンである、ァンピシリン耐性トランスホーマントを選択した。

16. 観損えカップアトコード配列の免費に反カップアトの生産 組換えDNA分子由来の組換えカップアトの発現は原核性細菌 細胞、非常機真核性細胞及びより高等な(脊椎)真核性細胞を含 ブラスミドゥCTF314を制限エンドスクレアーゼ EcoR I で消化し、第2回の135~775番の残器に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。この641bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で単類し、ついで、アルカリホスファターゼ処理により殴りン酸化した。この放りン酸化した641bp断片を、Dra 国で消化し、第2回の296番及び297番の間の部位で、この641bp断片を切断し、これにより、162bp及び479bpの断片とした。このうち、479bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画により単難した。

上述のように周辺した296bp及び419bpの断片を、T.4 DNAリガーゼを用いた反応により機能的に結合(ライゲーション)し、第2図の1番から715番の配列に対応するスクレオチドアグプター配列を有する175bp断片を作った。

クローニングプラスミドベクターpUC18をEcoRIによる 消化で縁状化する。上記のように調整した175bp 断片と、 EcoRI消化ベクターをTIDNAリガーゼで機能的に結合し、 環状組換えDNA分子pUCープレカロTFA-Tを作った。

大្国RRIを、pUC-プレトロTFカーTでトランスホームし、pUC-プレトロTFカーTを含むクローンであるアンピシリン耐性トランスホーマントを選択した。

超換えDNA分子pUC-ブレトuTFh-TをEcoRlで消化し、生成した715bp断片をサイズ分画で単離した。

カルーザース(Carothera) 等 (ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー(J. Am. Chem. Soc.) 、 1 0 3 他、 3 1 B 5 頁 (1 9 8 1年)) 及びゲイト(Gait)等 (コールド・スプリング・ハーベー・シンポジウム・クオント・バイオロジー(Cold. Spring Barbor Symp. Quant. Biol.) 4 7 他、393

む種々の発現媒体中で行うことができる。そのような発現媒体の 代表例には、各々、大陽国S。セレビシアエ(cerevisies)及び チャイニーズハムスター部巣 (CHO) 細胞がある。

a. 大路裏におけるプレトロTFトの発現

大陽関において、プレトロサドト構造遺伝子を発現できる組換えDNA分子は、例15で作ったpUC-プレトロサドト組換えDNA分子由来のプレトロサトはほ子合有DNA断片を単離し、ついて、この断片を原核性発現ベクターに複雑的に結合することにより構築することができる。

退換えDNA分子pUC-プレカuTFhを、そのプラスミド中に存在するEcoR1部位を部分的に切断するような条件で、EcoR1消化する。この部分消化法は、アニアチス(Beniatia)等、NY州、コールドスプリング・ハーパー、コールドスプリング・ハーパー・ラボラトリーズ、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニングにより詳細に報告されている。図2の残器1番から、1125番で示される配列に対応するヌクレオチド配列を含む1133bp断片を、サイズ分画によりEcoR1部分分解度効から単離した。

原核性発現ペクターア K K 2 2 3 - 3 (N J 州、ピスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社) を、 EcoR I による消化で線状化した。この消化ペクター及び I 1 3 3 bp プレ h u T F h 構造違伝子合有断片をT 4 D N A リガーゼを用いて機能的に結合し、環状組換え D N A 分子 P K K - プレ h u T F h を 他った。

大場面RR1キッドドープレカロTFAでトランスホームし、 pKKープレカロTFA合有クローンとしてアンピシリン耐性トランスホーマントを選択した。

b. 大肆前におけるbuTFhの発現・

大場留においてカロTF遺伝子を発現することができる組換え DNA分子は、例16 mで調整した1133bp所片を操作して構 切した。皮ずこの所片をアルカリホスファターゼで減りン酸化し、 ついて、制限エンドヌクレアーゼBbvlで補化した。生じた964 bpの断片は、第2図の残器164~1125智に対応するヌクレ オチド配列を含んでおり、サイズ分面により単糊した。 先に述べたように、

及び

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作り、ロザーステイン(Rotherstein)等(メソッズ・イン・エンザイモロジー(Hethods in Enzyeol、)68巻、98頁(1973年))の方法に従って、結署とcoRI及びBbvl来略を含む二本額 DKAリンカー断片をアニーリングすることにより作った。このリンカーをまず964bp 断片に機能的に結合して、1008bp 断とした。ついて、1008bp 断片を、T4DNAリガーゼを用い、EcoRI前化したベクターpKK223-3と独能的に結合し、環状超換えDNA分子pKK-huTFhを作った。

組換えDNA分子。KK-カロTPねは、。KK-ブレ hotfb と、山茂杏1~129香の残菌がない、及び四新しいメチオニンコドンが、残蒸130番の前に機能的に結合しており、その結果 タンパク質発現(翻訳)が挿入されたメチオニンコドンの場所で 始まることだけが異なる。

組換えDNA分子 pKKープレカロTFA及びpKK- bufFA を、その中に合まれる構造遺伝子によりコードされるトロTPA

た。それからこの選択したトランスホーマントをクローン化し、 モノクローナル抗体TF8-5G9を用いて、発現するプレ カuTFhタンパク質の存在を各クローンについて検定して、 pSV-プレカuTFhの存在に関する選択を行った。

d. CHO細胞におけるカロTFカの発現

本乳類相節において、huTFhを発現することができる組換えDNA分子を、例16c由来のpSVープレhuTFhを、制限エンドヌクレアーゼBellで情化することにより構築した。生成した1153 bp 断片をサイズ分画で早難し、つづいて、制理エンドヌクレアーゼBbvlで消化した。生じた974 bp 断片は、図2の残器164~1125番の配列に対応するヌクレオチドアダプター配列を含み、これを、サイズ分画により早難した。

先に述べた方法で、

及び

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を合成し、アニールして、粘着性 B m l l D 及び B b v l 来端を含む二本額 D N A リンカー新片を作った。ついで、このリンカーをT4DNAリガーゼを用いて974b p 断片に複能的に結合して、第2図の残器 130~1125番の残器の配列に対応するヌクレオチド配列を含む、1018 b p 断片を作った。

プラスミド発現ベクター pKSV-10を、BalBで消化して 級状とし、ついで、T4DNAリガーゼを用いて、1018 bp 断片に機能的に結合し、環状組織えDNA分子 pSV-buTPb を作った。

組換えDNA分子 pSV-プレカロTFh及び pSV-hoTFh

又はプレカロTFAの免現に適合する原核性得主媒体に導入した。 そのような宿主媒体の代表例は、大陽菌RRJ株である。この信 主を、超換えDNA分子でトランスホームし、細胞増殖とこの超 換えDNAの発現に適合する条件下で培養し、この発現したタン パク質を従来の技術を用いて収穫した。

c. CHO細胞におけるプレhuTFhの発現

脊椎動物和酸中、プレトッTPト遺伝子を発表で含る組換え DNA分子を例16 a で調製した1133 bp 断片を用いて排築 した。

カルーザース (Carvibera)等及びゲイト (Gait) 等の方法 (上記) を用い、

S'-AATTCCCGGG-3'

5 ' - GA.T C C C C G G G - 3 '

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作った。 ついでこのオリゴヌクレオチドアダプター断片を、ロザースタイン (Rotherstein)等の方法(メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.)68巻、98頁(1973年))を用い、1133bp断片の各来端に結合し、元々1133bp断片に存在するEcoR1粘着来論を、Bs11貼着来端に転換した。

東核性シミアンウイルス (S V 4 0) を基本とする発現ペクター、 p K S V - 1 0 (N J、ピスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社) を、制限エンドヌクレアーゼBel I による消化で縁状化した。 1 1 3 3 b p の Bel I 通合断片及び、Bel I 抗化ベクターを、 T 4 D N A リガーゼを用いて、機能的に結合し、環状組換え D N A 分子 p S V - ブレカ u T F N を作った。

大編画RRIを、 pSV~ブレトuTFトでトランスホームし、 アンピシリン耐性のトランスホーマントを選択し、クローン化し

を、内在する構造遺伝子によりコードされるAuTFA又はプレ AuTFAタンパク質の発現するのに適合した真核性宿主媒体中 に導入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、CBO 細胞がある。

指主を、組換えDNA分子でトランスフェクトし、安定なトランスホーマントを従来法で選択した。例えば、グラハム(Graham)等、ピロロジー(Virol.)、52巻、456頁(1973年)及びサウザーン(Southern)等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス(J. hol. Appl. Genet.)1巻、327~341頁(1982年)参照。トランスホームした宿主報数を、相数増殖及びその組換えDNA発現に適合した条件下で培養し、発現したタンパク質を、従来法により収穫した。

*. イーストにおけるプレカロTFhの発現

S. セレビシアエ (cerevisiae) において、プレカッサFA 遺伝子を発現できる組換えDNA分子を、先に述べたように、

5'-AATTCCCGGG-3'

5'-CGCCCGGG-3'.

の配列をもつオリゴヌクレオチド、アダプター断片を合成し、ついて別16aの1133bp断片の末端に、それを結合することにより構築した。このようにして作ったアダプター化した断片は、Clal 粘着末端をもつ。

イーストの発現ベクター、 pTDT1 (アメリカン・タイプ・ティシュコレクション、 #ATCC31255) を、制限エンドヌクレアーゼClaIでの情化により縁状化した。上記のClaIアダプター化1133bp 断片及びClaI情化ベクターを、T6DNAリガーゼを用いて、複雑的に結合し、環状の超換えDNA

分子pYープレhuTPhを作った。

大時間RRIモプレカロTFカでトランスホームし、プレカロTFカ構造遺伝子を発現するトランスホーマントを、例16cで述べた方法により同定及び選択を行った。

1. イーストにおけるhuTFhの発現

S. セレビシアエ(cerevisiae)において、huTFh構造 遺伝子を発現できる超換えDNA分子を、pY-プレカuTFh のCleiによる情化により、第2回の残器1~1125等の配列 に対応するスクレオチド配列を含む1151bp 断片を作ること で構築した。サイズ分画による単類後、1151bp 断片をBbv Iで情化し、第2回の残器164~1125零の配列に対応する スクレオチド配列を含む978bp 断片を作った。この978 bp 断片は、サイズ分画により単難した。

及び

の記列をもつ合成ポリスクレオチドアダプター断片を作り、先に述べたように、アニールすることで、Clal及びBbv 1 粘着末端をもつDNAアダプターを作った。まず、このアダプター断片を、978bp 断片に機能的に結合することにより、1020bp 断片とした。つづいて、この1020bp 断片を、T4DNAリガーゼを用い、例16 で述べられているように調製したClal情化pTDT1ベクターと結合し、環状観換えDNA分子pYートuTFhを作った。

超換えDNA分子 pYープレカロTFA及び pYーカロTFA も、内在する構造遺伝子によりコードされるカロTFA又はプレ カロTFAタンパク質の発現に適合するイースト者主媒体中に導

17. ポリペプチド p2 4 - 3 5及び p1 5 9 - 1 6 9による凝集 国事

第7度にそのアミノ酸残器配列を示した例11で述べたように 合成した。

第 7 衰

 ペプチド名
 アミノ政務器配列

 p24-35
 第一番MEPRPPWROVYI-08

 p159-169
 第一部プリングWISSSSSKWTAK-08

a、各ポリペプチド実験名は、第1回に含まれているアミノ散発 基配列を進わしている。

従って、ポリペプチド p2 4 - 3 5 及び p1 5 9 - 1 6 9 は本発明の h u T F h ポリペプチ ド 特合部位類 収物を示している。 また、ポリペプチ ド p2 5 - 4 9 で 得られた同様の 結果を考慮すると、 p2 4 - 3 5 で 得られた 結果は、 h u T F h - 因子 W / W a 結合部位は、 これら 2 つのポリペプチ ド の共通部分、 すなわち、

入した。このような媒体を含む音主細胞の代表例には、S。セレ ビシアエ (cerevisise) 細胞がある。

唐主相勝を、この組換えDNA分子でトランスホームし、選択 培地で培養して、従来性により、トランスホームした相随を単離 した。例えば、ハイネン (Binnen) 等プロシーディング・ナシ ョナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Hatl. Acad. Sci.) USA、75 巻、1923頁(1978年)及び、ミヤジ マ (Hiyajima) 等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオ ロジー (Hol. Cell. Biol.) 4 巻、407頁(1984年)参 履。トランスホームした細胞を、細胞増殖及び組換えDNA発現 に適合する条件下で培養し、ついでこの発現したタンパク質を徙 来法で収穫した。

8. 組換えれってFトコード配列の発現による可給性カップPhの生産

超換入DNA分子からの可溶性 h u T F h の発表は、プレ h u T F h 及び h u T F h に対し、例15 で述べたのと関核に、後々の発現媒体で行なわれた。その例において、EcoR 1 粘着 法 端を有する断片を含む 1 1 3 3 b p のプレ h u T F h 排洩 遺伝子の例16 a での作成と、つづいて、例16 b ー 1 での 機 作で、大路 画、S。セレビシアエ (cerevisiae) 及び C H O 知 題の 3 様 の発現 媒体において、プレ h u T F h 下 N 大 R 九 u T F h を発現できるベクターを作った。 同様に、EcoR J 粘着 末端を有する可溶性 プレ h u T F h 排洩 遺伝子を含み、例16 a で調製した805 b p の 断片を例16 b ~ 1 で述べた方法に健かって 操作し、これ 6 局 発現 媒体中可溶性 プレ h u T F h 又は h u T F h を発現できる スペクター (すなわち、プレ h u T F h ー T R 又は h u T F h ー T R)を作った。

第1回で示した残蓄30~35、(-VNQVYT-)のアミノ 放残器配列で作られていることを示していることに往目すべきで ある。

18. 抗カロ丁F抗体による凝集阻害の速度論

抗ね u T F 抗体が、 ね u T F の 数 集 閉始 を 阻害できる 時間を 測 定するため、この 阻害の 時間 経過を、 例 1 0 で 述べた 阻害 検定 権 を用いて 測定した。

例7で述べたように調製した、MAPS単離化TP8~5G9モノクローナル抗体およそ1 ng を、100μ4HBS/TBS中、例4で述べたように類製した再脂質化 hnTPおよそ1 ngと混合した。このように形成した程々の混合物を、37でで、約1から60分の間の種々の時間維持し、抗 hnTP抗体を、huTPと免疫学的に結合させ、免疫反応座物を作った。第13回で示した時間に、各混合物について、例2で述べたように、huTPの森血活性を検定し、ついで、例10で述べたように限害率を示した。

第13図で、このような速度論的測定の結果は、この検定で用いた抗体及び情報したカロTFの構度で、65%以上のカロTFによる凝集関始の阻害が、10分以内に起こることを示すことが分争。より高い抗カロTF抗体構度では、より速く、完全な阻害が起こると考えられる。

19. 抗トロTF抗体による、トロTPによる凝集開始回答の投与一応等

抗体投与範囲にわたる、AuTF将集開始を阻害する本発明の抗AuTF抗体の能力は、次の修正をした例で述べた方法により 検定した。例4で調製した再踏質化AuTFlnsを、C.lns のHBS/BSA中、例7で述べたように単難した、担々の者の

特表平1-503438(27)

TF8-5G9モノクローナル抗体と混合した。このように興製した混合物を維持して免疫反応度物を作り、つづいて例10で注べたように、buTFの森血活性に関する検定を行った。

そのような技与一応答校定の結果を、第14回に示し、 たた、 このことはこの研究で用いた h u T F 遺皮に対し、 m 4 当り、 お よそ 1 ~ 5 n g の抗 h u T F での最高値の半分の阻害を示してい る。

一同様の投与一応答実験を、huTF諏として溶解したヒト細胞 を用いて行なった。

ヒトの繊維芽的飲系列GM1381(NIGMSヒューマン・ジェネチック・ミュータント・セル・レポジトリー)を、2mM グルタミン、5%ウシ胎児活性及び抗生物質を持った、ダルベコ体正イーグル特地(DMEM、NY州、グランドアイランド、ギブコラボラトリー)中、37℃で、7%(ッ/ッ)二酸化炭素空気芽囲気下で培養した。GM1381初胎を増殖し、そして収穫し、さらに30×10。個の純粋のベレットを達心で関製し、一70℃で凍枯した。この凍枯ベレットをHNパッファ(25mM ペペス、140mM NaCE、pH7.0)中の15mMペータ、オクテルグルコピラノシド溶液 9 msを溶解した後、HN18msをに10分間37℃に維持して、細胞を溶解した後、HN18msを加えて、細胞溶解物を作った。

例17で述べたように単離したモノクローナル抗体TF8-5G9を、第15間に示した種々の投与に対し、001%BSA(シグマ、R1A級)で帯釈した。それから各抗体帯釈動25μ2に、先に課題した相胞溶解動225μ2を加え、50分間37でに保って、抗体を細胞溶解物中に存在するhuTFと免疫反応させ、免疫反応産物を形成させた。その後、25mM CaC2。

ーシェン混合物100μ2を、50μ2のヒト因子で欠損血法及 び50μ2の50mM CaC2 に添加することにより測定した。37℃、1分後、相同種の血液の10倍粉軟物50μ2を因子で減として加え、凝血形成時間を2度測定した。

24個のMoAb のうちの18個がパブーン諸TF又は、アフリカ・ミドリザル腎臓細胞抽出物のプロコアグラント活性を照害した(第8巻)。しかし、MoAb のいずれも、ラット、ウサギ、子ウシ、イヌ、辛又はブタのTFと、交差反応を示さなかった。すなわち、相同的因子知識の存在下、ヒト因子切欠失血漿のリカルシフィケーション時間促進能を示すTF顕製物ではなかった。 依体のいずれも、正常なヒト血腫での検定による、ウサギTFのコアグラント活性を示さなかった。 50月1年、免疫反应度物を含む溶液 50月11と混合し、ついて、 50月11のクエン酸化にト血漿と混合し、凝集を開始させた。このようにして作った混合物を37℃に維持し、血費の熱加と、凝血形成の間の時間を測定した。効果的トロTF環度及び阻害率を例10に述べたように計算した。

20. 非ヒト組織因子とMoAbの交差反応性

助物TF(TF活性をもつ複組積抽出物)による抗体図書を、 次のように測定した。等容量のTF(1 m/ m2)及びハイブリ ドーマ上待(TBS/BSAでの10倍等状物)を、37でで2 時間インキュベートした。残存するTF活性を、そのインキュベ

英 8 英

		RIA ¹		ドット ウェスタンブロット			阻害卒工	
noab	747945	(cpa)	7071	R	KR	凝血"	W *	の阻害
TFB-5C4	JeGI. =	6242		±		96	~ 57	
TFB-5G9	laGl. #	28587	;	-	7	99	80	
TFB-11012		29453	Ţ		7	99	82	
TF9-1F1	IgG1, #	25133	+	•	+	95	83	и.3
TF9-105	1261. z	3872	+	+		95	76	M.3
TF9-187	12G1. #	28586	+		4	97	90	n.3
TF9-188	1s61, #	28552	•	+	+	98	83	n.3
TF9-1B9	IsG1. #	28523	4	+	+	97	84	H.3
TF9-2C4	146], E	24435	•	•	+	97	78	n.3
TF9-2F5	lgS1, #	27422	٠.	+		97	79	n.3
TF9-4D11	IgG1, #	25994	4	+	+	97	81	n.3
TF9-5G4	1 gG1, #	24073	+	4	+	97	83	H.3
1F9-5B7	1 g 6 1 . K	25819	Ť	+	+	97	74	H.3
F9-5C7	IgG1. #	24543	4	+	•	. 96	72	n.3
1F9-6B4	1 s G 1. s	17894			+	96	98*	n.3
TF9-664	1 # G1. #	24065		+	4	95	78	H.3
TF9-6C9	lgGl. #	8054	+	+	+	95	47	
TF9-7E10	IgG1. #	8025	•	+	+	97	54	
TF9-8E3	3 gG1. ⊀	29152	+	+	4	97	76	n.3
TF9-9E1	1gG1. #	18169	+	+	+	90	71	n.3
TF9-9C3	leGl. a	30222	+	+	. +	97	82	n.3
F9-9B4	1 zG1. #	33728	+	+	+	95	82	н. 3
TF9-10C2	IgG1. #	28692	+	•	4	98	71	н.3
TF9-10810	IEG1. #	24585	+	+	+	0	20*	••
PA 5100	IgG, «	1929		-	-	0	0 -	••

第 9 表

モノクローナル抗体TF8-5G9による、

種々の細胞及び組織の基血活性の配案

TF链性课	抗体なし	F 语 PAb	性(% 100		3-569
特製ヒト語でド	1569	1520	(3%)	245	(B4Z)
相疑抽出物	2059	2059	(0%)	411	(80%)
相贴毁抽出物	1287	1344	(02)	159	(883)
GH1381微鞋穿細胞(溶解化)	990	966	(2X)	143	(86 X)
ヒト単球 (溶解化)	2893	2745	(5 %)	175	(94%)
J82 膀胱がん細胞 (溶解化)	882	902	(0X)	93	(892)
ウサギのトロンポプラスチン	2106	2108	(0X)	2157	(01)

- 精製したヒト扇丁Fを、テスト前にリピロトピヒクルに再構成した。
- 2. 右の2つの側は、指示されている特製!8Gで処理した後端定した、ミリユニットで表わした残留TF活性の2回の平均値が示されている。残存するTF活性の側定前、サンプルを3? でで20分間、10μ8/m8の18Gとインキュペートした。カッコ内の値は、抗体なしの関サンプル活性ユニットに対する四番率が示されている。

21. 因子Vi 结合の研究

因子ザノゼミのTFへの結合は、機能性TF:ゼノザミ森無便 遠複合体の無合に必要とされるので、因子ゼノザミのTFに対す ろ結合を妨げることによる、第8表に示したMSAbのTF括性 中和能がテストされた。

ヒトの組織因子仲介による、因子はのJ 8 2 の誘誘がん相触表面への結合はよく調べられている。フェア (Fair) 等、ジャー

 特にことわらないかぎり、全ての結果は、ハイブリドーマ組 福培養上滑の10倍等款物を用いて得られたものである。毎分 当りのカウント数(cps)で表わされているラジオイムノアッ セイの結果は、ラクトパーオキンダーゼを使ってラベルした 3381-TFを用いている。

- 2. 遠元 (R) 又は非遠元 (NR) のサドを用いて行ったウェス タンプロット。
- 3. 特製したヒトの脳TPによって誘導されるヒト血法の凝結の 図字。
- 4. J 8 2 細胞に対する特異的 ***] 因子VI / VI 2 結合の図書。
- 5. 粗ヒヒ臼抽出物(B) 又は溶解COS細胞(M)により誘導されるヒト血素凝集阻害。MoAbが60列以上の凝血器性を阻害するとき、文字がその後の場所に入れられている。

様々のヒト智髄及び組織により発現される森血活性の阻害をMoAb TF8-5G9を用いて詳細には味した。TF8-5G9は、J8G漢度≥1月8/m2のときの90%以上、精製再踏質化したヒトTFの機能を中和する(第16図)。ヒトの細胞溶解物及び組組機抽出物の森血活性を図書する、このMoAbの能力も示されている(第9表)。10月8/m2の18G液度でのTP8-5G9は、組経及び胎盤のTセトン粉末及び溶解したヒトの機能非認能、膀胱がん細胞及び内毒素活性化末槽血液単核細胞の凝血活性の80%以上を定量的に阻害する。

ナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chea.)、262巻、11692(1987年)。従って、報助表面 hv7F: ゼノゼ a 複合体会合に関するM。Ab の効果は、J82 細胞を、 坑体とプレインキュペートし、さらに、 ***1 - 因子ザノゼ a の 特異的結合を定量することにより試験した。

JB2細胞を12六培養プレート中、フェア (Fair) 特によ って報告されているように(上述)、魚密化するまで培養し、パ >7 x A (137 mM NaC4, 4 mM KC4, 11 m sol, Lーグルコース、 5 mMアジ化ナトリウム、 1 0 mMへペス、 p H 7. 4 5)で洗浄し、ついで、精製したMoAb I z G 又は、 ハイブリドーマ培養上清10倍岩釈物を含むパッファAG.7g& とともに、37℃で2時間インキュベートした。塩化カルシウム 及び、「**」ー因子物/するを各々、最終決度5mM及び1mM となるよう添加し、さらに37℃、2時間インキュペートした。 その後、細胞単層を、冷パッファB (1 4 0 m N m C & 、 0.5 **MBSA、5mMトリスHCℓ、pH745)で5回洗浄し、1** adの0.2M NaOH、1%SDS、10mM EDTA溶核中 で溶解し、その溶解物のガンマ線をカウントした。特異的結合は (非ラベル因子VI/VIaを100倍過剰存在下、細胞と会合する した。特異的結合の風客率は9容のパッファAと、1容の符集培 地で処理したコントロール細胞に対する、M o Ab で処理したJ 82細胞という形で測定した。

因子 W / W a が T P に結合したとき、それはうまく取り込まれないが、抗体結合による T P インターナリゼーションの可能性を はくため、 J 8 2 和節を、 5 m M アジ化ナトリウムで代財的に乗 致した。 和胞のアジド処理の有無にかかわらず同じ結果が得られ た。

この研究の結果は、上の第8表に示されている。TF活性を関 客する全ての28個のMoAbは、因子サノVa 結合も阻害した。 予想されるように、TF活性を阻害しないMoAb、TF9-10月10は、因子Vの結合を阻害しなかった。

22. J82毎跑による因子Xョ形成の阻害

J 8 Z 柏馳上でのhuTF:双/Կ a 複合体による因子 X a 形 成遺皮を、次の修正をした、フェア(Fair) 等(ジャーナル・ オブ・パイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 、 2 6 2 巻、 1 1 6 9 2 頁(1 9 8 7 年))により報告された、多 穴培養プレート検定法を用い 2度定量した。相数を、12穴プレ ート中で培養し、J82相敗への因子VE/VE>結合の際に上述し たように、検定開始前、積々の護度の精製した、MoAb のI&G 百分と37℃で2時間プレインキュペートした。単一の温度の因 子VI/VIa(1 m M)を検定で採用した。因子Xを最終濃度50 με/ = εとなるよう添加した後、5、10、15分の間隔で、 50μ2の上浦を採取し、550μ2の50mMトリス・HC2、 2 2 5 mM NaCl、50mM EDTA (pH & 2) の溶液中 に入れた。発色性因子Xa若質添加後(TX州、ピューモント、 ヘレナラブ社、 2.4 mM S-2.2.2.2 5.0 μ &) 、速度論的分 折モジュールをつけたペックマンDV-30分光器で405ヵm の吸光度の増加を測定することにより、因子Xの活性を定量した。 因子リノリョ非存在下でインキュペートしたJ82級敗上滑のS - 2 2 2 2 加水分解によるパックグランドを各測定値から差引い た。抗体処理の固害率は抗体とのプレインキュペーションなしの 超越に対して計算した。

M o Ab T F 9 - 2 C 4 及びT F 9 - 5 B 7 による J 8 2 細胞

の処理に対する阻害曲線は、因子× m 形成速度が、因子 N 結合を 阻害したものと同様の抗体環度で阻害されることを示している (第17回)。 非阻害的 (非中和性) MoAb TF9-10H10 は I a G 環度 10 p g / m g を で、 凝血促進活性、因子 V / V m s 結合又に因子× m 生成速度にほとんど影響を与えないし、また、 コントロールMoAb P Ab 100は全く効果がない (データ示 さず)。

23. huTFhポリペプチドの因子リノリョへの競合的結合による。 182 細胞上での因子X活性化の顕著

当分野ではよく知られているように、凝血促進プロテアーゼカ スケードの短胞活性化は、消費性血栓出血症と呼ばれる種々の病 気と関連している。一般に、森血促進プロテアーゼカスケードは、 膜レセプター及び基本的共因子、組織因子(TF)に対する因子 VI/VI:の高い我和性による発見により、細胞表面で開始する。。 TF及び因子VI/VI » の二分子森血促進復合体(TF: VI/VI ») は、最終的にトロンピン形成及びフィブリンの折出につながる限 定したタンパク質分解による因子X及び以の活性化を起こす。さ らに、最前におけるTPの役割、TPによる登集プロテアーゼカ スケードの開始は、措理性血管内凝固及びトロンポジェネシスと 関連する。ニーメツ (Kienstz)等、ブラッド (Blood) 4 2 巻、 4 7頁(1 9 7 3 年)及びベビラクア (Bevilocqua) 等、ジャ ーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Hed.) 、 · 1 6 0 巻、 6 1 8 頁 (1 9 8 4 年)。 TFは、炎症性仲介物に対 する応答及び知応性免疫応答で、単球及び内皮細胞の表面で発現 する重要なエフェクター分子である。

本発明のhuTFhボリベブチドが、因子ロノWaに結合し、 それにより、因子Xを活性化することができる、TF:W/Wa

第10表 . holfポリペプチドを用いたJ82 細数に関するX活性化の函客

	•
カッ アドポリペプチド	光学密度,
PBS	0.960 ± 0.083
因チリノリョなし	0.005±0.001
p 1 - 1 8	1.007 ± 0.087
p 1 - 3 0	1. 0 9 8 ± 0. 0 2 8
p 1 1 - 2 8	0. 6 8 7 ± 0. 0 7 1
p 2 4 - 3 5	0. 4 7 7 ± 0. 0 1 7
p 2 6 - 4 9	0. 4 3 7 ± 0. 0 2 0
p 4 0 - 7 1	0. 8 1 4 ± 0. 0 5 3
p 7 2 - 1 0 4	0.781 ± 0.047
p 9 4 - 1 2 3	0.818±0.055
p 1 2 1 - 1 5 5	0. 8 8 9 ± 0. 0 6 7
p 1 4 4 - 1 5 9	0. 5 0 7 ± 0. 0 5 3
p 1 4 6 - 1 6 7	0.004 ± 0.001
p 1 5 7 - 1 6 9	0. 3 8 9 ± 0. 0 3 5
p 1 6 1 - 1 9 0	0. 6 0 0 = 0. 0 2 3
p 1 9 0 - 2 0 9	0. 6 2 5 ± 0. 0 3 1
p 2 0 4 - 2 2 6	0. 7 1 5 \pm 0. 0 4 2
p 2 4 4 - 2 6 3	0.619±0.047

もし、光学濃度(O.D.) が約0.5 0 0以下なら、因子Xの活性化の阻害は有意であると考えた。

本研究の結果は、カロTFhボリペプチFp24-35、p26

- 49、p 1 4 4 1 5 9、p 1 4 6 1 6 7 及びp 1 5 7 -
- 169は、因子VI/VIaに結合し、因子Xを活性化できる、TF
- : VI/VI = 複合体の形成を図客することを示している。これらの

複合体の形成を阻害する能力を研究した。

TBS中、100μMのカセTFポリペプチド類似物を含む熔 後50マイクロリットル (με) を、86次平底ポリスチレン検 定プレートの各ウェル96個に入れ、ついてその各ウェルに、別 8で述べたように単離した、TBS中1nMの建度に調整した因子 YI/VIaを含む溶液25μ&を加え、さらに、TBS中20mlの塩化カルシウム25μ&を加え、その混合物を80分間食温に 維持した。

ヒト膀胱がん知取 J 8 2 初取を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC HTB1; MD州、ロックヒル)から入手し、参考としてここに超込まれているフェア (Pair)等の方法 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー)、2 6 2 巻、1 1 6 9 2 − 1 1 8 9 8 頁 (1 9 8 7 年)) に従って済奏した。

50 p 8 の T B S に 5 × 10 4 個の J B 2 細胞を延偏し、上述の維持を行った後、ポリスチレン検定プレートの各ウェルに入れた。その後、ただちに、フェア (Fair) 等の報告のように (上述) 早難した、T B S 中 100 n Mの機度の因子 X 25 p 8 及び、X a 発色 盃 質 S ー 2 2 2 2 (1 m / a 8 T B S) 5 0 p 8 を加え、混合し、その混合物を 2 分間 宜温に栽持して、発色反応 座物を含む 複複とした。

生成した発色産物量を、V-max 9 6 大スペクトロホトメータ (カリホルニア、マウンチン・ビュー、モレキュラー・デバイス 社)を用い、405ナノメーター (nm) での光学密度 (0.D.) を測定して定量した。ポリペプチドの代りにTBSを用いるか、 又は、因子VA無添加のコントロールも測定し最高及び最低OD値 を決定した。これら図客の測定結果を第10変に示す。

結果は、本発明のカロTF結合部位ポリペプチF鎖似物が凝集を 退害するのに用いることができることを示している。

24. 抗カロTFb MoAb による凝集の生体内での顕著

しばしば、グラム降性相関による腐敗症は、最終的に死に至ら しめるショック状態を起こす。このヘモスタチスシステムの乱れ は、このショック状態の展開と密接に関係している。テイラー (Iaylor) 等(ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション (J. Clin. Invest.) 79巻、918~825頁 (1987年))は、外的に加えられた活性化した、タンパク質 C、天然の抗毒血酵素、は、凝気応答及びヒヒにおけるL D.e.s。 の大語質温度の致命的効果を妨害する。

M o A b 投与及び3 0 分間の平衡化の後、各動物は、L D: **

の大路笛の投与を受けた(約101°個、投与後約8~16時間で 敗血性ショックのため死をもたらす量である)。大路區は2時間 に減り注入により投与した。この研究結果を第11表に示す。

第11表 ヒヒの敗血性ショックによる政死の生体内における阻止

グループ	Boab	投 与	益政,	大路 寶 在 入	死
I . 7>10-3	TP9-587	500	Normal	No	No
1-04cc. I	BB*	500	Norma)	Yes	Yes
I, A U	TF9-517	500	Normal	Yes	No.
	TF9-587	.150	Normal	Yes	No

- 血圧、凝集活性化及びフィブリン分解室物を含む値々のヘモスクチスパラメータは、MoAb投与後、大陽国注入前に測定した。
- HBは、TF9-587と同じ鎖及び延續のMoAbであるが、無関係の抗原と免疫反応を起こす。

第11表にみられるとおり、McAb TF9-5B7を受けた ヒヒはLD...の大幅図の投与に対しても生存しつづけた。HoAb 150g8/は及び500gg/Mの両投与で保護された。さら に、コアグロバシーと関係する、顕著な低血圧、凝集カスケード 活性化およびフィブリンの分解は、McAb TF9-5B7を受けた動物で著しく緩和された。

25. ヘモグロビン・アルファ鎮としての、 5 8 k Da h u T P へ テロダイマー軽鎮の特徴

免疫気和性単難したTPをさらにウェスタン・ブロット分析で 特性を調べ、58kD huTPヘテロダイマーの成分、すなわち、 例4で述べた47kD。及び125kD。タンパク質を同定した。

なるという結論を支持している。

使って、現在、例もで述べられている5 8 kDa ヘテロダイマーの12.5 kDa 経賃成分は、ヘモグロビンのアルファ復であり、47kDa huTFタンパク賞との会合は、huTF単型操作のアーテファクトであると考えられている。

別1~25の結果のまとめと對抗

2 つの異なる細胞融合体由来の、ヒト脳TFに対する、24種のMoAb ライブラリーについて報じられている。各MoAb の免疫特異性は、ドットプロット、ウェスタンプロット及びラジオイムノアッセイにより特徴づけられた。ほとんどのMoAb は、全ての3条件下、ヒトの本来のTF及び変性TFと反応した。MoAb の1つ、TF8-5G9は、TFタンパク質のルーチンな特製にうまく使用することができる。それは組織抽出物由来のTF括性を吸着し、ミリグラム量の特製ヒトTFを一定して与える。

MoAbの1つ以外の全ては、精製したヒトはTPの機能活性を強く中和する。いくつかのMoAbは、ヒヒ及びサルのTPと交換反応をすることが分っているが、相同的因子可の存在下、ラット、ウサギ、子ケシ、イヌ、羊、又はブタのトロンボブラスチンにより開始した因子可欠損ヒト血族の凝集を、どの抗体も固常なヒト血族の凝集開始は、どの抗体によっても関客を受けず、このことは、ヒトTP凝血活性の関客は、因子可/可まを含む、可溶性血無数血タンパク質への抗体の妨害によるものではないという結論を支持する。

抗TFによるTF凝血活性の阻害に対する最も別解な原因は、 因子・U/VI●結合のブロックである。予想されるとおり、全部で 例6cで述べたように行った、ウェスタンプロット分析を、電気放動するサンプルとして、例9で述べたように講楽した、免疫観知性により車難したねれて下、特製したヒトへモグロビン、又は、分子量標準を用いて行った。指示されているところではジスルフィド特合の運元のため、サンブルパッファの中に50mMのサギスレイトールを含めた。ウェスタンプロットを、非免疫化ウサギ1gG、従来の方法で調製したウサギ抗ねれてド1gG又は、ダコ(Daco)(カリホルニア、サンタバーパラ)社から入手したウサギ抗ヒトへモグロビン1gGを用いて、示されているように免疫反応した。最初の2つの1gG期間物は、例7で述べたように早間したMAPS-Iである。

上で述べたウェスタンプロット分析の結果は、第18回に示した。抗れ u TF I g G は、運元型 h u TF の 4 7 k D a の バンドとの み免疫反応を起こし、1 2.5 k D a の バンドとは反応しなかったが (パネルA、レーン 3)、一方、同 I g G は、非運元型 h u T P の 5 8 k D a 及び 4 7 k D a の 両 パンドと免疫反応を起こした (パネルA、レーン 4)。これらの結果は、5 8 k D a へ テロダイマーの 4 7 k D a 成分としての h u T P の 同定と一致している。 筑へモグロビン I g G は、非運元型 h u T F サンブル中の 5 8 k D a バンドとの み免疫反応を起こし、4 7 k D a の モノマーとは 反応しなかった (パネル B、レーン 4)。しかし、 銃へモグロビン I g G は、 還元型の b u T F サンブル中の 1 2.5 k D a パンドと免疫反応し (パネル B、レーン 3) また、1 2.5 k D a の 精製した ヒトへモグロビン・タンパク質と免疫反応した (パネル B、レーン 2)。 非免疫 ウサギ I g G との 反応は なかった。

上記の結果は、非漢元型カロTFの 5 8kDa の分子は、ジスルフィド結合でヘモグロビンと結合した 4 7kDa カロTFから

23個の抗凝血 (中和性) MoAb は、TFの基本的レセプター 機能と一致して、J82細胞への因子リノU2の特異的結合を妨 ぐ。さらに、このことは、因子V1結合及び、因子X2形成速度の 限客のハーフ・マキシマルが同じI2G満度のときに起こる、選 沢した精製MoAb の投与演定においても実践される。

ヒトTFに対するMoAb は、最近、カーソン(Carson)等 (ブラッド (Blood)、7 D 色、4 9 D 頁 (1 9 8 7年)) によ り、これを直接試験したのではないが、因子リノゼュ結合の妨害 によることは明白に、TF活性を阻害するものであると報じられ た。24個のここで述べられているMoAbのうちの23個が、 TF活性を強く中和するという知見は往目に値する。機のヒト蔵 血タンパク質に対するM o Ab を用いた当出職者の研究室で行っ た実験は、少数の割合のものが機能活性を中和するというもので ある。基本的TPとの交差反応性が合む、反応性が各々異なるこ とから、ハイブリドーマ全てが兄弟クローンであるとは思えない。 さらに、進行中のエピトープマッピング研究は、この種のMoAb に少なくとも3つの別々の非競合抗体結合部位が確認されること を示している。それゆえ、TFに対するMoAb を中和する大部 分のものは、機能にも関係するわずかな免疫的に優勢なエピトー プによるものでもないらしい;事実、ホブ (Bopp) 券により (モレキュラー・イムノロジー(Hol. Imausol.) 2 0 色、 4 8 3 頁(1983年))TFのアミノ政紀列は、多くの抗原活定基を 含んでいることが報告されている。

小さいサイズのTFは、なぜ、そんなに多くの抗TF MoAb が因子VI/VI a 結合をブロックするのかを部分的に設明している。 TFは、 cDNAクローニングにより、グルコシル化を除いて、 25kDa の細胞外ドメインをもつことが予想されている。それ

特表平1-503438(31)

ゆえ抗体及び囚子は「Vis分子は、より小さいTFの知胞外ドメインへの結合に立体障害を示しことになる。この立体障害仮説は、TF上の炭化水紫鏡がおそらく機能には必要ないことから(ナカムラ(Makamura)、トロンポペモスタチス(Trom. Remost.)58巻、185買(1987年))、コンカナベリーノAはTF活性を阻害する(ビトリック(Pitlick)ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション(J. Clim. Invest.)55巻、175買(1875年))という観察と一致する。

それは、種々の相応及び組織により発現した因子で依存凝血活性は、間様の機能をもつ、1つ以上の分子種に寄因するということに、いくらか関連している。しかし、M。Ab TF8-509は祖職及び胎盤抽出物及び溶解した総雑弊細胞、腱靴が心細胞及び末梢単核細胞の凝血活性を定量的に阻害する。完全ではないが、これらの結果に、現にTFに寄因する細胞性凝血活性は、同一ではないときも抗原的に関連しているという結論を支持している。このことは、TFに対する単一の遺伝子がおそらく存在しているという知見と一致している。

最近、敗血性ショックの致死効果は、凝血プロテアーゼカスケードにおいて、中間段階での役割を果している抗凝血タンパク質、活性化したタンパク質にを往入することにより、ヒヒにおいて妨ぐことができることが示されている。本研究は、TF活性を選者するM。Abは、凝血プロテアーゼカスケードの関始のプロックにより、それらが、血管内凝血の病理学的活性化と通常関連している、血質凝血因子の情費を妨ぐので、生体内で、非常に特異性の高い抗凝血剤であることを示している。

例4で述べた5 8kD。型のhuTFは47kD。のTFタンパク質と、現在では免疫化学的にまた部分的アミノ設配列により、

抗丁ド抗体との反応で観察された。 5 8kDa パンドの一部を含む、これらマイナーな分子機は、丁ドと他の未同定タンパク質問で形成された、混合ジスルフィド結合物を示している。

特別の駐楼及び例を含む先の明和は、本発明の説明を意図した ものであり、これを限定するものではない。多くの他の変化や、 修正が、本発明の精神や範囲を逸融することなく行うことができ ス へモグロビンのアルファほと同定されている、およそ 1 2 5 k D a のポリペプチドの、ジスルフィド結合で結合しているヘテロダイマーであることが示されている。 5 8 k D a のペンドは、天然の初防性TFのヘテロダイマー型であるという以前の推察は誤りであるだろう。

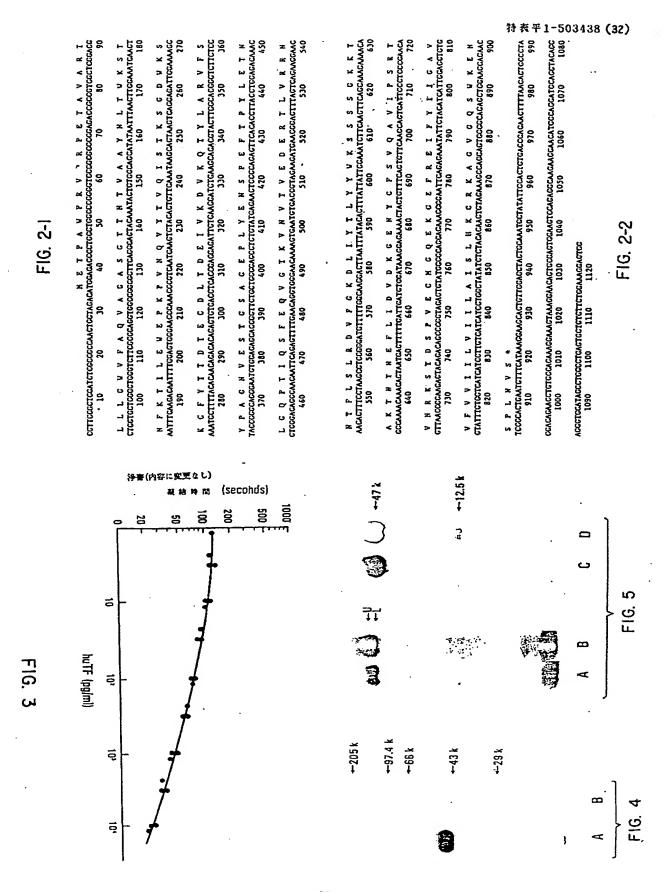
ヘモグロピンのアルファ貸は、1つのシスティンをもち、また TPは、 cDNAから、その細胞質ドメインに1つのシステイン を有することが予想される。またTFは、細胞外ドメインには4 個のシステインをもつが、TF機能が還元により失なわれること から、少なくとも2つが護内ジスルフィド結合に使われているは ずである。TFの細胞質ドメイン中の1つのシスティンは、ほと んどの知数質ゾルタンパク質中のシスティンのように、選元型で 維持されているだろう。この(TPの他のシステインは、ありそ うもない) システインは、細胞溶解後、混合ジスルフィド形成の ため容易にアクセスでき、そして、単點級作間での酸化で、TF の知政質及びヘモグロピンのシステイン間でジスルフィド結合が 形成すると提唱される。この結論は、ヘテロダイマー形成は、明 らかに時間依存性があり、脳アセトン初来由来のTFの界面活性 刑抽出と、免疫親和性マトリックスへの結合との間の時間を小さ くすることが、得られるヘテロダイマーTP黄を彼少させる観察 を支持する。推定される96kDa のTFダイマーも、単群の際 同様のメカニズムで形成するであろう。

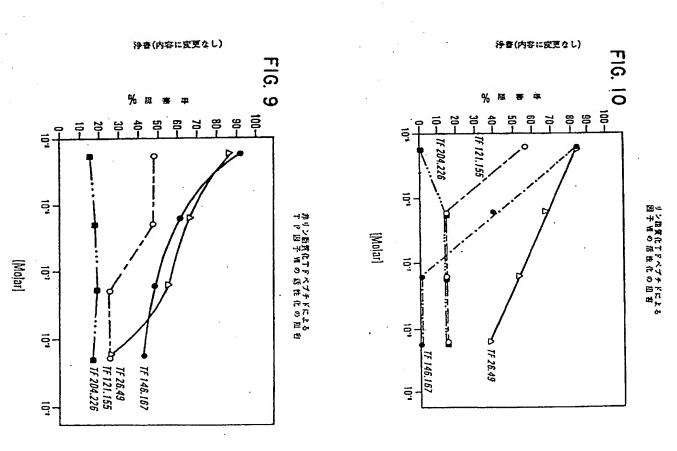
抗ヘモグロビン抗体カラムは、3つの5 8kDa のヘテロダイマーを特異的に結合したが、免疫競和性で特製したTF調整物中に試験できる高分子量機全てを定量的に除くことはなかった。
4 7kDa 以上の分子量をもつ他の底跡量のマイナーバンドは、

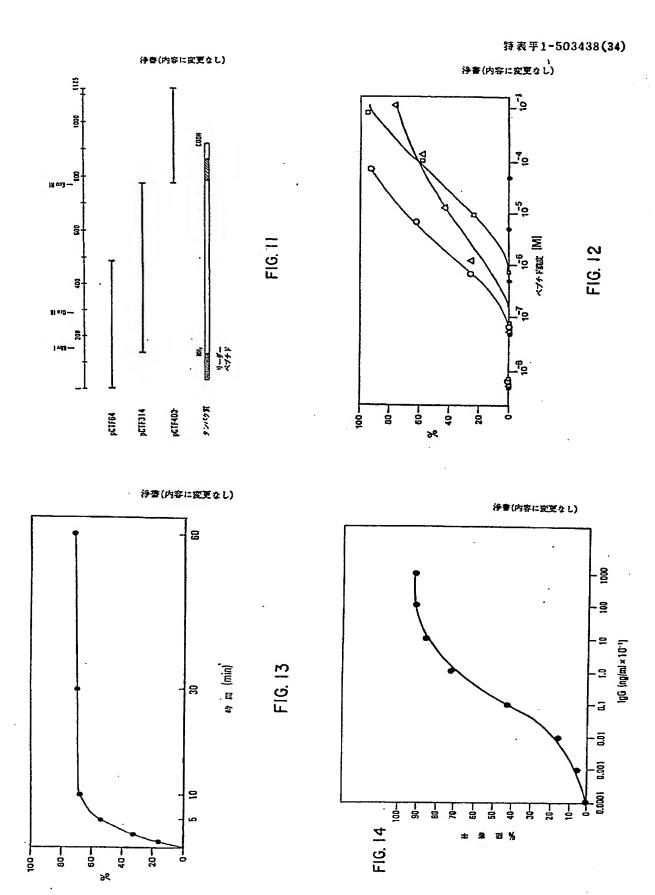
	-30	-20	10
ME	TPAWPRVPRP	ETAVARTLLL	GWVFAQVAGA
10	20	. 30	40
SGTINTVARY	nltwkstnfk	TILEWEPKPV	ngvytvgist
50	60		
	· -	70	80
KSGDWKSKCF	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARVPSYPA
90	100	110	120
GNVESTGSAG	EPLYENSPEP	TPYLETNLGQ	
		_	
•			
130	140	150	160
TKVHVTVEDE	` RTLVRRNNTF	LSLRDVFGKD	LIYTLYYWKS
170	180	190	200
SSSCKKTAKT	NTNEFLIDUD	KGENYCFSVQ	AVIPSRTVNR
			AVEFORTVIA
		•	
210	220	230	240
KSTDSPVECM	GQEKGEFREI	FYIIGAVVFV	VIILVIILAI
250	2		
	260		
BLHKCKKYGV	GQSWKENSPL	NVS	

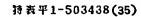
FIG. I

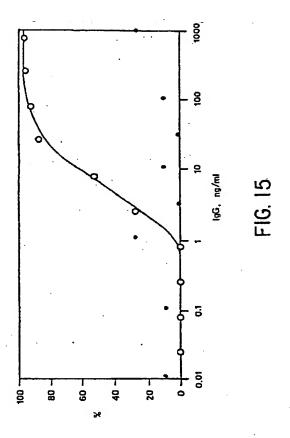
÷,

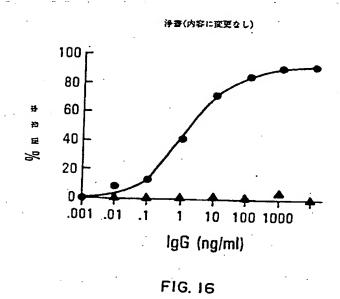


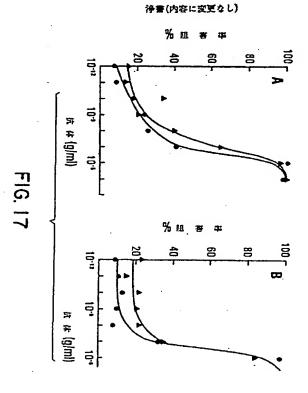


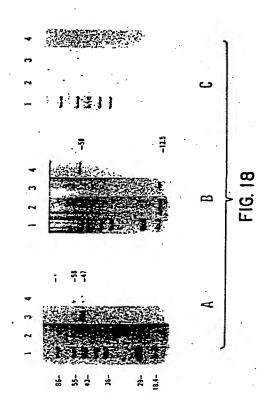












持表平1-503438 (36)

平成 年 月 日

特許庁長官 吉田文 設 及

1.事件の表示 PCT/US88/00998

2. 発明の名称 ヒトの組織因子に関連するDNA 断片・ポリベプチド及び抗体

3.補正をする者 事件との関係 出 頭 人

> 名 称 スクリップス クリニック アンド リサーテ ファウンデーション

4.代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 電話(代)211-8741

氏 名 (5995) 弁理士 中 村

5. 補正命令の日付 平成1年8月22日

5.補正の対象 明細書及び請求の範囲の翻訳文 図面の翻訳文(第3、9、10、 11、12、13、14、16、17図)

7.補正の内容 別紙のとおり

明細書、請求の範囲の誤訳文及び図面の翻訳文 (第3、9、10、11、12、13、14、16、17図 の浄書・(内容に変更なし)

方 菜 ①



ISL/CS

OUPTIME INTOCRATION CONTINUES FROM THE RECOVER PARTY X.P. S.M. SCARPATI ET AL. "Rumen tissue | 1.15-14 | Sactors CDNA sequence and chromosome | 2-10/15 | Sactors CDNA sequence and chromosome | 16-10/15 | Sales Commission of the game" Sion | 2-10/15 | Sales Commission of the game" Sion | 16-30/15 | Sales Commission of the sequence of the game of the sequence of

CALABOTEATURE OF MARKET WATER AS THE CONTROL TAKEN THE T

and market hely

	LOTS CONSIDERS TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND BY Cames of Determin, with require, where proposed of the relevant appropria	
¥ !	J.B. KITTLER ET AL, "Identification] 1-3s
- 1	Of a CDNA clone for bovine tissue	and
	isclor". Temperation Proceedings.	43-58
	Volume 45, page 1639, abstract no.	
	937, published May 1984 by The Pederation of American Sociation	
	Federation of American Sociation	
	for Experimental Biology	
	(Bethesda, MD, UEA). See antire document.	
x.p	E.H. SCARPATI ET AL, "Human tissua	
Ŷ, F	factor: cDNA cloning, primary	11,11-14
-,	structure, and chromosome	and 17
•	atructure, and chromosome localization", Federation,	2-10,48
•	Proceedings, Volume 46, page 2242	: Jw and
i	abstract no. 1846, published	1 42-54
,	1 May 1967 by The Federation of	1
	American Societies for Experimental	-
:	Wiology (Bethesda, MD, USA).	
:	See entire document.	i
Z . P	J.M. MORRISSEY ET AL. Moleculer	1-5,44-
Y.F:	cloning of the CDMA for human timeve factor, " Federation	13 800
	tissue factor, " Federation	
•	Proceedings, Volume 48, page 716, abstract no. 2338, published	6-10, 14-10, 10-30
	abstract no. 2338, published	14-40.
	1 May 1987 by The Pedaration	1
į	of American Societies for Experimental Buology (Bethesda,	400
	MD, USA). See entire document.	42-5#
		!
Y :	S.D. CARSON ET AL. "Monoclonal antibodies against bovins tissue	: 1-3b
	antibodies against bovine tissue	ano
:	factor, which block interaction	42-54
•	with factor VII, , Blood, Volume 66, pages 152-156, published	:
	July 1005 by the termines fortished	:
!	July 1985 by the American Society of Rematology, Grune & Stratton, Inc.	İ
:	(Orlando, Fla., USA). See especially	1
•	pages 152-155.	•
		•
X, P Y, P	J. H. HORRISSEY ET AL, 'Molecular	. 1-5.
	Causing of the CDRA for tissue	. 113
	cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the	and 17
	countation protesses asserts	6-10.
	congulation processe cascade", Cell, Volume 50, pages 129-135,	14-10
	published 3 July 1987 by Cell	10-30,
	Press (Cambridge, Mass., USA).	42-2a
	See entire occument.	44-28

Υ .	R.B. AEBERSOLD ET AL, "Electroblotting onto activated glass". The Journal or Biological Chemistry, Volume 161, pages (129-4238, published 25 March 1906 by The American Society of Biological Chemiste, Inc., Maverly Press (Baltimore, MD, USA). See especially page 4225.	21-5+, 42-+e and 53-5#
	Finetroblotting onto activated glass'. The Journal of Bological Chemistry, Volume 261, pages 4229-4228, published 25 March 1966 by The Aberican Society of Biological Chemists, Inc., Warring Press (Baltimore, MD, USA).	A 1140
•	glass', The Journal of Biological Chemistry, Volume 26: pages 4229-423B, published 25 March 1906 by The Aberican Society of Biological Chemists, Inc., Moverly Press (Baltimore, MD, USA).	
	Chanserry, Volume 261, pages 4229-4228, published 25 March 1906 by The American Society of Biological Chemists, Inc., Mawariv Press (Baltimore, MD, USA).	53-20
٠	4229-423B, published 25 March 1906 by The American Society of Biological Chemists, Inc., Waverly Press (Baltimore, MD, USA).	
	biological Chemists, Inc., Waverly Press (Baltimore, MD, USA).	
	Biological Chemists, Inc., Waverly Press (Baltimore, MD, USA).	
	Waverly Press (Baltimore, MD, USA).	
	See especially page 4229.	
	Res exhanterry hand aven.	
Y.P	Chemical Abstracts, Volume 107,	1-36
2,5	where to tested 26 October 198/	ADG .
	(Columbus, Ohio, USA), S.D. CARSON	42-50
	ET. AL. "An inhibitory monoclonal	
	antibody against human tissue	
	done - and name 539.	
•	factor", see page 539, the Abstract No. 152425h, Blood	
	1987, 70(2), 490-3(Eng.)-	
	1981, 10(2), 430-3(2031).	
	Chemical Abstracts, Volume 108.	1,11-14
X.P	Dumber 9, issued 29 February 1908	anc 17
Y, P	(Columbus, Ohio, USA), K.L. FISHER	20.
	ET AL , "Cloning and expression	15,16
	of human tissue factor cDNA", see	10-30
	pages 195-196, the Abstract No.	204
	70091c, Thromb. Res. 1967, 48(1),	42-20
	89-99(Eng.).	
Y	A. HINNEN ET AL. "Transformation	7-3- 800
	ne waser. Proceedings of the	42-20
	wastenal Arademy of Sciences	
	USA, Volume 75, pages 1929-1933,	
	munitahad Angil 1978 Dy KD#	
	national bendamy of Sciences Of the	
	United States of America (Washington	
	D.C., USA). See especially page	
	1929.	
¥	M. HOUGHTON IT AL. "The emino-terminal	7-70
-	secuence of human dibroblast interieron	anc
	he Andread from reverse transcripts	42-50
	primers', Pucleic Acids Research Volume 8, Number 9, pages 1913-1931, published May 1950 by IRL Press Limited	
	Volume B. Number 9, pages 1913-1931,	
	published May 1950 by IRL Press Limited	
	(oxford, Ingland). See page 1913.	

	·	

第1頁の統領	·		
SInt. Cl.	4	識別記号	庁内茲理各号
C 07 K	7/08 7/10 13/00		8318-4H 8318-4H 8318-4H
C 12 N C 12 P G 01 N	5/00 21/02 33/53	٠.	B-8515-4B 6712-4B D-7906-2G L-7906-2G
//(C 12 P C 12 R C 07 K	33/577 21/02 1:91) 99:00		B 7906 2G

⑫発 明 者 モーリジー ジェイムズ エイ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン デイエゴ カチ ミノ キオスコ 7955

特許法第17条第1項又は第17条の2の規定 による補正の掲載

昭和63年特許願第50355号(特表平 1-503438号、平成 1年11月22日発行公表特許公報)については特許法第17条第1項又は第17条の2の規定による補正があったので下記のとおり掲載する。

	Int.Cl.		識別 記号	庁内整理番号
	C12N	15/09	ZNA	
	C07K	7/06	'	B318-4H
		7/08		8318-4H
		14/435		8318-4H .
		16/18	}	8318-4H
	C12N	5/10		
	C12P	21/02		C-9282-4B
		21/08		9161-4B
. //	ASIK	39/395		N-9284-4C
	G01N	33/53		L-7055-2J
		•		D-7055-2J
		33/577		; 7055-2J

(続きあり)

手統補正

7、3.28 平成 年 月 日

特許庁長官 高 島 東 股

1.事件の表示 2 昭和83年特許服第50.8555号

2.発明の名称 ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ポリペプチド及び抗体

3.補正をする者

事件との関係 出 職 人

名 称 スクリップス クリニック アンド リサーチ

4.代 联 人

住所 東京都干代田区丸の内 3 丁目 3 番 1 号

氏 名 (5995) 弁理士 中 村

5.補正命令の日付 自 発

6. (木楠正により確求の範囲に記載された請求項の数は合計「5!」 となりました。)

7.補正の対象

明細書および請求の範囲の推

8. 補正の内容



平成 7.12.20 発行

Int.Cl.	識別 配号	庁内整理番号	
		A-9281-4B C12N 15/00 -ZNA B-7729-4B C12N 5/00	
·			
ű.	-		

- 1. 請求の範囲を別紙の通り補正する。
- 明報音64頁7行の「BLOTTO」の後、『PBSにおける、5% m/p 非脂肪 粒燥ミルク、0.01%アンチフォームA (ングマ親)、及び0.0001%マー チオレート (serthiolate)) 1 を抑入する。
- 3. 同88頁18~14行の「TF8~5G9……TF8~5G9」を「TF 85G9、TF8~5G9及びTF8 5G9」と補正する。
- 4. 同89頁19行の「8a」を「2 A」と補正する。
- 5. 両8 9 頁 2 0 行の「8」を「2 A』と補正する。
- 6. 同70頁9行の「TF8-589」を『TF8-5G9』と補正する。

請求の報題

- (1) ヒトの組織因子重填タンパク質をコードする構造遺伝子を規定する配列を含 む、わずか12000ヌクレオチド塩基州を含むDNA断片。
- (2) 上記構造遺伝子が、以下のアミノ散残基配列を有するタンパク質をコードす る、請求の粒囲(I) 記載のDNA断片。

			•
. 40	30	20	10
NOVYTVQIST	TILEWEPKPV	nltwksthpk	SGTTNTVAAY
80	. 70	60	50
YLARVPSYPA	DEIVKDVKQT	YTTOTECOLT	KEGDWKEKCP
120	110	100	90
PTIQSFEQVG	TPYLETNLGQ	eplyenspep	GNVESTGSAG
160	150	140	. 130
LIYTLYYWXS	LSLRDVPGKD	RTLVRRNNTF	TXVNVTVEDE
. 200	 190	180	170
AVIPSRTVER	KGENYCPSVQ	NTNEFLIDVD	SSSCRRTART
240	230	220	210
VIILVIILAT	PYLIGAVVPV	GQEKGEFREI	KSTDSPVECH
		260	250
•	NVS	GQSWXENSPL	SLHKCRKAGV

平成 7.12.20 発行
(3) 上記標連通伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、南次の配囲(2) 記載のDNA断片。

S C T K K T V A A Y N L T U K S T TUCKCHARACTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTO	M F K T I L E W E P K P W H Q W Y I W Q I S T K S C D W K S MITICAACACATITICAACACACACACACACACACACACAC	K C F Y T T D T E C D L T D E I W E D Y E Q T Y L A R W F S ANTECITIACACACACACACACACACACACACACACACACACAC	Y P A G N V E S I G S A G R P L Y E N S P E F I P Y L E I N TACCOCCADCAATSTCCACCOCTTCCACCACCTCTCACACAC 310 310 400 400 410 420 430 440 450	L G Q P I I Q S P E Q V G T K V N V I V E D E R T L V R N CTOCRACACCACACATTCACACTTITAMCAGTGGGAAAAAGTGAAAGTTAATCACACAACACAAC
	N F K T I L E U ANTICAACACTITICAACTCCE 190 200	K C F Y T T D T I	Y P A C N V E S 1 TACCCCCACCAATCTCCACACAC 370 370	L C Q F T 1 Q S F CTCCCACACATTCACACTIT 460 470

(4) 上記構造遺伝子が、以下のアミノ酸技差配列を有する可熔性ヒト組織因子重 娘タンパク質をコードする、辨求の範囲(1)記載のDNA断片。

		•	:
10	20	30	40
SGTTNTVAAY	nltwkstnfk	TILEWEPKPV	· NQVYTVQIST
50	60	70	. 80
KSGDWKSKCP	YTTDTECDLT	DEIVXDVXQT	YLARVFSYPA
90	100	110	120
GNVESTGEAG	EPLYENSPEP	TPYLETNLGQ	PTIQSFEQVO
130	140	150	160
TKVNVTVEDE	RTLVRRNNTP	LST BDA LCK D	LIYTLYYWKS
170	180	190	200
SSSCKKTAKT	NTNEPLIDVD	KGENYCPSVQ	AVIPSRTVÝR
•		·· · .	<u>.</u>
210			
KSTDSPVECM	GQEKGEFRE	. • .	

V N R K S T D S P V E C K G GTTAACGGGAAGACACACACACACTACACTCTAACCCC 730 740 750

(5) 上記構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(4)

PEFTPYLET N CCACACTTACCTCCACAAC 430 440 450 Y P A G N V E S T G : TACCCCCACCAATCTCCACACCACCCTT

- (8) 上記配列(第1の配列)の5~末端に連続し、かつ上記タンパク質のアミノ 末端に結合した、アミノ設技能リーダ配列をコードする第2の配列も含み、か つ該第1及び第2のDNA配列がヒト組織因子重頼前駆体タンパク質をコード する流成構造遺伝子を規定する、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (7). 上配混成構造遺伝子が、以下のアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコー ドする、請求の範囲(8)記載のDNA断片。

10	20	30	40
SCTTNTVANY	nltwkstn p k	TILEWEPKPV	ngvytvqist
50	. 60	70	80
KSGDWKSXCP	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARVPSYPA
90	, 100	110	120
GNVESTGSAG	EPLYENSPEP	TPYLETHLGQ	
			1119512910
	•		
.130	140	150	160
TKVNVTVEDE	RTLVRRNNTP.	LSLRDVFGKD	LIYTLYYWKS
170	180	190	200
SSSCKKTAKT	NTHEPLIDVD	KGENYCPSVQ	AVIPSRTVNR
210	220	230	240
KSTDSPVECH		PYLIGAVVEV	
	adminst up!	TITIONVOLO	AIIFAIIFYI '
•			
250	260		

SLEKCRKAGY GQSWXENSPL NVS

(8) 上記提成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (7) 記載のDNA断片。

Q I S T K S G D V K S
CANTANGCACTANCTOCANANGC
240 250 260 270. i V T V E' D E R T L V R R N
NTTEACGGTAGAAGATGAAGGGATTTAGTCAGAAGGAAG

\$10
\$10 8 N F K I I L E W E P K P W N Q V Y T V
ANTICAGACACANICCCAACCCAACACTCAACTCTACACTCTTC
190 220 230 5

- ドする、鎖水の範囲(8) 記載の DNA 新片。

. не	-30 TPAWPRVPRP	-20 ETAVARTLLL	-10 GWVPAQVAGA
10	20	30	
SGTTNTVAAY	nltwkstnpk	TILEWEPKPV	ngvytvqi st
50	60	70	ao
KSGDWXSKCP	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	
90	. 100	110	- 120
GNVESTGSAG	PPLYENS PEP	TPYLETNLGQ	PTIQSPEQVG
130	140	. 150	160
TKVHVTVEDE	RTLVRRNNTP	LSLRDVFGKD	LIYTLYYWXS
		•	
170	180	190	200
SSSGKKTAKT	ntneplidud	KGENYCPSVQ	AVIPSRTVNR
210			٠
KSTDSPVECM	GQEXGEPRE		

(10)上紀混成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を育する、

I I C A V ATCATTCCACCTCTC 800 810

Q E K G E . F R E CAGACANTICAGACAN

V N R K' S T D S P V E C H O C 740

윮.

H T F L S L R D V P C K D L I Y T L
AACATTECTAACCTCCCCCCATTITICCCAACACTTAATTAATACACT
550 550 550 550

Q S V K E N CACACCTCCAACCAAC 890 900

S P L N V S
TCCCACTCATCTTTCA
910

E載のDi	VA断片。				
. 8 2	-52	្គ ន ខ <u>ុ</u>	" ដ ន	- 48	- 99
_ §	, Š .	₹ ~	_ F _	_33	
٠ <u>۲</u>	<u>,</u> ₹.	<u> </u>	<u>با</u> د	, Š	_ 3
> 20	ခ [§] ရ	2 5 0	~ 85	_ 2 E _	> 50
< 8 °	-£=	ა გ %	~35≈	* 65 \$	្តិដូន
N E. T. P. A. V. P. R. P. R. P. E. T. A. V. A. R. T. A. M. A. GARACCCTGCCTGCCTGCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	LLLCVVFAQVACAS CTTXTVAAYN LTVKST ctcticticccctoccttocccaccttcacatatacaatatatotoccacatataatitaati	N F K I I L E V E P K P V N Q V Y T V Q I S I K S G D V K S ANTICHARACANITITICAGIGGEAMCCCAMACCGITEMICAMAGC 190 200 210 220 240 250 250 250 250 270.	K C F Y T T D T E G D L T D E I Y K D Y K Q T Y L A R V F S AMTGCTTTIACACACACACACACACACACACACACACACACACA	YPACH FITPYLETY SACTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTO	L C Q P T I Q S F E Q V C T K V N V T V E D E R T L V B R N CTCCCLACACACACACACACACACACACACACACACACAC
ωξ _ο	* ¥°	×₹。	~ ₹~	۳Š	a g
~ છુ^	7 ¥ ₹ 92	⊬ ₫ %	កន្ទុង	~ F.3	≈ § 8
æ 8	∢ ধূ	~ ß.	~ g	ယဗ္ဗ	a 5
~ 8	∢ઇું	\ {	≃ ≸	⊾ ર્ફ	ωŠ
> \text{\text{G}} &	> 6 3	-38	>- 5 5 5	ងដូនូ	25.8
≈ §	► ਨੂੰ	> [5	₽ \ 2	≖ ≶	۳۵ أ
<u></u> ∺	≈ Ş.	<u>+ کو</u>	×3	۳ Ş	, > 52
2 H S	r 0 0	7 6 8	> 5 ≳	× 15 9	≖ ₹ 8
٠ ٢	+ 5 °	> 15 "	~ E ~	٦ <u>5</u> ₹	> £ ~
• <u> </u>	ဗဋ္ဌိ .	~ ₹	₩ Š	~ <u>5</u>	×{
- 33	្តដ្ឋ	≖ 3 a	° ខ្លី ន	^ឃ ខ្ព័ន្ធ	۲.۵ ۶
ખ કું	< છુ ¬	> 5 ~	H S m	ပ ဋ 🔾	မပ္ပိုင္ခ
× F	° 8	~ 8	E	٧ ي	۶ ج
	< છુ _	×₫。	្តដ្ឋ	νE.	૦૬
	្តិទូន	_ 56 ±	ဗီဗို	မ်မ္ပည္	m 5 2
	ె క్ర	ᄦᄹ	™ర్థ	- §	~ E
	≺ કુ	2 5	± 3	۷ Ş	νβ
	" 5 3	3 55 55	2 kg 2	380	ទុំខ្ពុំ
	2 g	¹Ę	- 3¥	۶ ق	- 13
	<u>. 6</u>	. §	~ §	- ₹	₩
	័ុខ្លួន	្តទីទ	, É s	ိုမွ်စွ	~ g g
	- 5 -	<u>* 3</u> ~	~ E ~	. გ	~ हुँ ३
	7 55	_ E	3 25	~ 8	ပ ပ္ပ
•	- 5	≖ ≨	~ ₹	~ ≰	<u>ع</u> ت

88 M T F L S L R D V F G K
AACACTITCTAACCTCCCCCATCITTTCCCAAC

平成 7.12.20 発行

(11)とト組織因子重験タンパク質をコードする構造速伝子を規定する第1の DNA断片に機能的に結合したペクターを含む組換えDNA分子。

(12)上記様造遺伝子が、以下のアミノ監残基配列を有するタンパク質をコードする、情求の範囲(II) 記載の組換えDNA分子。

10	20	. 30	40
SGTTNTVAAY	NLTWKSTNPK	TILEWEPKPV	NOVYTVQIST
			•
		•	
50	. 60	. 70	. 80
KSGDWKSKCP	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARYPSYPA
	•		
•	:		
. 90	100	110	120
GNVESTGSAG	EPLYENSPEP	TPYLETNIGO	PTIQSPEQVG
		• •	
130	. 140	. 150.	160
TKVNVTVEDB	RTLVRRNNTP	LSLRDVPGKD	LIYTLYYWKS
•			
170	180	. 190	200
SSSCKKTAKT	NTNEFLIDVD	KCENYCFSVQ	AVIPSRTVNR
	••		
·			
<u>\$</u> 10	220	230	240
KSTDSPVECM	GOERGEPREI	PYIIGAVVPV .	VIILVIILAI
•		: •	
. 2,50	- :. 260		•
SLHKCRKAGY	GOSWKENSPL	พงร	

(13)上記様達達伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を育する、領域の範囲 (11) 記載の組換えDNA分子。

r 5 €	~ 8 8	~ ភូ ខ្ល	× 3 8	2 2 3
S G T T M T V A A Y N L T V K S T TRACCACACTACAACTACAACTACAACTATAATTTAACTTCCAAATTAACT 110 110 110 110	∡ ≩ ‴	~ <u>₽</u> "	₩3°	≃ છું "
<u> </u>	> §	> =	 ∑	~ ડું
ာ ဗို ဝ	4 × 0	~ g ~	752	> 5 a
~E=	_ 3 g %	₹ ₹	_ S 3	ីទីឧ
_₹	, š	្មិន្ទ	. F	L E
ΞĘ	្តិទី	76		Ď
ុំ ដូខ		, F 3	_ § 8	. 38
7 1	787	- 5 L	F 5 3	m S v
۷ کا	~ §	~ ફું	⊯ ઙુઁ .	کِوْ ۵
< 8 _	- È-	¥ \$	~ છે_	ო გ
> 65 53	~ ₹ ₹	P- E E	∞ដូនូ	> 52
نا بر	> 5	a 5	≈ ≱	⊷ဋ
= 15	⊢ 5	¥ 3	₩ Ş	> 15
+ ₫ 0	.≻ 5 0	> H o	> ₹ o	₹ 5 8
r g̃≃	> 5 2	-Ęä	7 2 2	> 5 %
ូ ស្គី	~3	u Š	~ B	×₹
. w S _	* E	ຸ້ຊີ	× 55	₽ð.
S C T T R T V A A Y N L T U K S T racecenterateceacterature 130 150 150 150 150 150 150 150 150 150 15	H F X T I L E W E P. K P V B Q V Y T V Q I S T K S G D V K S MITTCHACACAITITICAGAGGACATCCAAACCCCTCATTCAAAAACC 190 200 210 220 240 250 260 250 260 270.	K C F Y T T D T E C D L T D E I V K D Y K Q T Y L A R V F S AANTGETITIAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	Y P A G H V E S T G S A G R P L Y E H S P R F T P Y L R TACCCCCACCCACACCTICACACACACACACACACACACA	L C Q P I I Q S F E Q V C I K V H V I V E D E R I L V R R R CTGGGGGGGGGGATTTGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
	~ 8	그걸	5 €	> <u>2</u>
	, Š	_ §	~ E	28
	្តិថ្ន	្តមិន	E 2	# 4 5 2 4 4
	4 ≥ ~	្ខម្នុ	្តខ្លួក	E &
	- 8	_ 3	្តិភ្ញ	_#
	_ § _	์ วิจี	์ ซี _	§
	- 3 8	3 5 5	~ 3 %	~ ₽ ₹
	~E	_ ≥	^ 5	~ ₹
	" \(\bar{2} \)	~ 5	≖ <u></u> {	F 3
	* 35 g	~ É =	ဗမ္မမ	• g &
	× 3 ~	~ F.~	< 23 %	094
	-E	2 5	~ <u>X</u>	မ ဦ
	≈ ≨	¥ ≩	≻≵	٦ ۾

(14)さらに、上紀第1の断片の5′末端に連続し、かつ上記タンパク質に結合した、アミノ酸機基リーダー配列をコードし、かつ技第1及び第2のDNA断片が、上記タンパク質の前駆体をコードする混成構造遠伝子を規定する、値求の範囲(11) 記載の組換えDNA分子。

(15)上配混成構造遺伝子が、以下のアミノ酸残基配列に対応するアミノ酸残基配列に対応する。 列を有する、上記タンパク質の前駆体をコードする、請求の範囲(11)記載の 組換えDNA分子。

_				
· • Q B	÷ ₫ ₽	>22	z 5 8	
24 ₹ ¯	~ <u>3</u> ∩	< 5 T	్టు కై ్	
. ∡.≷	ភូមិ	2 5	ي پ	
ູ້ຊີ	_ <u>[</u>	ĨĒ,	_8_	•
28.2	_6₹	្តិទីនី	_ 5 %	•
	. ૄૈફ્રે	ે કે	. S	
ຶ ≱ີ	۶ و	~ £	్రే క్ర	
~ Es	₹ 9g	"Eg	ပည့် ၁	
и <u>Б</u> .	~3≥	5 %	> £ =	
× ₹	> E	ra ₹	ပ ဗ္ဗ	
2 G	νĘ	≈ ⊈	₹ Š	
> ₹8	~ E 8	4 E E	C R K .A C Y G Q S U K E N TOTACAAAGGCAGACTTCCAAGCTTCCAAC 870 880 890 900	
× Iš	ပဠ	ы ჴ	∝ 3 ¯	
⊒ E	≽ 5 2 ⊀	ပင္ထ	ပန်	
卢호교	¥ 5 o	×₹°	* 5 °	
~ `	" ₹ 2	7 5 5	្នថ្នង	
E	. š	28	L H K CTACACAAG 860	
⊿ ₹	ک د	្ល័ម្ភ	_ H	
258	E 58	្តិខ្លួ	. 58	
္မွ မွ <u>်</u>	_ 8_	. F	CCTAIAT	
<u> </u>	- 5	6	~ 8	
. Fe	~ § .		~ <u>5</u> _	
ES	1 13 3	≻ુદુ≾	-23	
7 E	J.E	<u>~</u> 8	CATCATCC 840	
ి శ్ర	* E	٣ğ	۶ کے	
۳ ږ ږ ږ	* Š 5	- ខ្លី ទូ	-6a	
٦ ٢ .	≖ § ~	~ ڳ	~ 55 €	ធដ្ឋ
νÖ	⊢ 5	~ ₽	~ }	> [-
H T F L S L R D V P C K D L I Y T L Y Y Y K S S S C K K T ANGOTTCCTANGCCTCCCCGATGTTTTCCANTCTTCANTCTTCANCTTCANCANACA S50	A K T N T N B F L I D V D K G E N Y C F S V Q A V I F S R T GCKAMCANGAGATATGAGGAGTATGAGGAGAAAGAGAGAGAGAGAG	V N R K S T D S P V E C N G Q E K C E P R E I F Y I I G A V GITAACCCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	V F V V I I L V I I L A I S L H K C R K A G V G Q S U K E N G STOTICECTORICATECTOCACACACTCACACACACACACACACACACACACACAC	S P L N V S TCCCCACTCATTCA 910
r E ∞	⊢ ឬ៍ ថ	표 않고	> 5 2 2	CCACTCA
⊢ ₽	×≨	≈ ∑	-Ĕ	.χ
≖ 3	ې کې	> È	> ₹	<u>ភ</u> ន្ត ្
-	-	-	G	F- '

平成 7.12.20 発行

(16)上記飛成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列に対応するヌクレオチ ド塩基配列を有する、請求の範囲(15)配載の組換え DNA分子。

NETPAUPRYPRETT AVART ATTENACIONACCIOCCIOCCICCICCICCICCICCICCICCOCCC 40 50 60 70 80 80 90	-52	n S S	~ 8 8	- 22	- 22
æ §	็ ผู้ ฐี "	_ ,	្តិ	_33	_3×.
۶ کا		_ §	្ន ទួ		_ 3
> 200	3 g =	, E	_ k_	.8	_ § _
~8"	- E ≃		2 8 2	_ 5 3	_ 6 \(\frac{1}{2} \)
⊢ 8	يَٰ کَ	~ 3 3		î.	E
کے س	5	្តីទី		. S	- 5
_ <u> </u>		_		្តីភ្ន	§ 8
2.8		3~	្តី		۳ ک <u>ا</u> ۳
- g	- 5	ຶ ≸	รัฐ	~ ≨	وَ ۵
	_8 ₌		. × ≴ 。	ិទ្ធ	™ 3
្តទ	្តទីន	్ లై స	>- 5 3	2 G 2	> £ %
ំ និ	1 2	<u> </u>	ិ គ្គ	# ×	۳ğ
·	.≖.≨	₽ 3	×₹	₩ 3	> <u>E</u>
168	1 2 3	~ § 3	> £ 8	F 2	* § 8
- B	. 3	٠ (١	3	Ĕ	> g "
. 8	. S	~ដ្	₩ ₹	- 5	∡ §
្តីដូទ	ËS	ື∄≳	* 8 a	™ š o	⊢ 32
្នីខ្ល	~ g ~	> ਉ ∾	- 3 -	ပဋိန	က ရှိ ဆို
~ 2	. 8	~ 8	- 5	- 5	> <u>E</u>
	380	_ ₹.	° 2 _	"E	~ ₹
	្ទខ្លួ≃		S B S	0 8 ×	₩ § ê.
	28		4	- 9	~ E
	8		3	48	8 E
	ŢĘ≅	្តីម្តីខ្ល	29 C	130	256
	<u> </u>	-F	3	> 5	-§`
	<u>.</u> 5	. 3	. 3	≈ ₹	₽ ₫
	L L C W V F A Q W A G A S C T T W T W A Y W L T W K S T CTCTCTCCCCCCATACACTICACACTACACTACACATACTCCCCCATACATTACTTCCACTTCCACT 100 110 110 110 110 110 110 110 110 11	N F K T I L E B F F F F B B Q V Y T V Q 1 S T K S G D B K S ANTTOMAGAITTECANTECAMECAMAGGGGAMGGGGATCTAMATAMCAGTAMGTAGGAGTTCGAMAGG 190 200 210 220 230 240 250 250 200.	K C F Y I T D T E C D L I B E I W K D Y K Q T Y L A R V F S AANTETITIACACAACACACACACACACACACACACACACACACA	Y P A C N V E S T G S A G I P L Y E N S P E F T P Y L E T N TACCOCCACCULATETICALCOCTTOCOCTOCACACTCCCCACACTTCACACCTTCACACACA	L C Q F I I Q S F E Q V C I K Y K V I V E D E R T L V R K K CTOZACACKCKACATTTACTCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACC
	g	<u></u>	_E~	₹8	~₫₹
	_ 8	ŢĒ.	\$	<u>~</u> 8	ပ နွ
	- G	~ 3	~ \$	~ \$	- 7 €

	-30	-20	-10
ME	TPAWPRVPRP	ETAVARTLLL	GHVPAQVAGA
10	. 20	30	. 40
SGTTNTVAAY	nltwkstnfk	TILEWEPKPV	novytvoist
	;		
. 50	.60	70	. 80
KSGDWKSKCP	YTTDTECDLT	DEIVKOVKQT	YLARVFSYPA
90	100	110	120
GNVESTGSAG	eplyenspep	TPYLETHLEO	PTIQSPEQVG
130	140	150	160
TKVHVTVEDE	RTLVRRNNTP-		LIYTLYYWKS
170	180	190	200
559CKKTAKT	NTHEFLIDVD	KGENYCPSVQ	AVIPSRTVNR
210	220	230	240
KSTDSPVECM	GQEKGEFREI	PYIIGAVVYV	AIIFAIIFYİ
250	260		
	GOSWKENSPL	NVS	

(17)上記ペクターが上記第1及び第2のDNA断片の複製を指揮しうる、請求の 製団 (11) 記載の組換えDNA分子。

(18)上記ペクターが、宿主網胎中、上記タンパク質を発現しうる、請求の範囲 (11) 記載の組換えDNA分子。

(19)上記ペクターが、宿主細胞中、上配前駆体タンパク質を発現しうる、請求の 税題 (14) 記載の組換えDNA分子。

2 9 Š G E ∴P L Y E N TCCCACCTCTCTATCACAN 400 410 130 130 ន្តន octtoacu V N Q CTCAATCA T B E ACCCACCA 310 2 2 210 °65 8 > ATCTCCACCACCAC o TCCACT 200 230 Tracka 170 7 200 N F K T I AATTTGAAGAGAT 190 K C F Y .T AMATOCITITACACAA 280 ACIOCCA 460 L L L C TCCTCCTCCC

(21)わずか50アミノ散残薬を含み、かつ、

-VNQVYTVQIST-, 及び

-LYYWKSSSSGKKT --

からなる群から選ばれた式で表わされる配列に対応するアミノ酸数基を含む、 ヒト組織因子結合部位ペプチド類似物。

(22)上記ポリペプチドが、式:

H-YNDYYTYDIST-OH

で去われる、請求の範囲 (21) 記載のポリペプチド類似物。

(23)上記ポリペプチドが、式:

H-LYYWKSSSSCKKT-OH

で表われる、請求の範囲(21)記載のポリベプチド類似物。

(24) H-BPKPYNQYYTYQISTKSGDWKSKC-OH.

H-VPGKDLIYTLYYWKSSSSCKKT-DH 、 及び

H-S3SGKKTAKTNTNBPLJDVDKGENYCFSV-DR.

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド類 似物。

(25)

H-SGTTNTVAAYNLTWXSTNFKTILEWEPKPV-OH, H-TKSGDMXSKC-OH, H-KSGDMXSKC-OH, H-ECDLTDEIVKDVXQTY-OH, H-LARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFFPYLC-OH, H-YENSPEFTPYLETNLGQFTLQSFLQVGTKV-OH, RU H-QAVIPSRTVNRKSTDSFVEC-OH.

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド類 似物。

(26)a)ヒト組織因子重旗タンパク質と免疫反応し、

b)

H-EPRYWGYTYQISTKSGDWKSKC-OH,
H-ÖGKDLIFILYYWKS6SSGKNT-OH,
H-ESSGKKTAKTHINEFLIDVDKGENYCFSV-OH,
H-SGITHTVAANLLIWISTNFKILLEWEPREV-OH,
H-TISGDWKSKCFYTIDTECDLTDLIVXDVKYFY-OH,
H-KSCDWKSKC-OH,
H-ECDLIDEIVKDVKQTY-OH,
H-LANVISYPAGNVESTGSAGEPLYENSPETTFYLC-OH,
K-YENSPETTFYLLTHLGOPTIOSFEOVGTKY-OH, RU

からなる群から選ばれた式で表わされるポリペプチドと免疫反応し、かつ c) DSPYBCM CQEKGEPRBI PYIICA で示されるポリペプチドと実質的に免疫 反応しない、

抗体分子を含む、抗体組成物。

(27)上記抗体がラベルに結合している、論求の範囲(28)記載の組成物。

H-QAVIPERTVHRKSTDSFVEC-OH; Rd.

(28)上紀枕体が、生理学的に許容しうる希釈剤中に存在する、鎮水の範囲 (28) 配載の組成物。

(29)ヒト越級因子重額タンパク質及び配列: BPKPY MQYYTYQIST KSGDWKSKC で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TP8-5G 9と命名されたハイブリドーマ。

(30)諫求の範囲 (29) 記載のハイブリドーマにより底生される抗体分子を含むモ ノクローナル抗体組成物。

(31)とト組織因子遺換タンパク質及び配列: EPKPV NQVYTVQIST KSCDWKSKC で表わされるポリペプチドと免疫区応する抗体分子を座生する、TF8-10 H10と命名された、ハイブリドーマ。

(32)競求の範囲 (31) 記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモ ノクローナル抗体組成物。

(33)とト組模因子重換タンパク質及び配列: VFGKD LIYTLYYWKS SSSCKRT で表 わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF9-884と 命名したハイブリドーマ。

- (34)前來の範囲(33)記載のハイブリドーマにより座生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (35)a) 身体サンプルを、ヒト組織因子重額タンパク質と混合し、免疫反応混合 物を作る:
 - b) この混合物を、上記抗体がサンプル中に存在するヒト組織因子と免疫反応し、免疫反応度物を形成するのに十分な時間維持する、そして、
 - c) ステップb)で生成した免疫反応疫物の存在を検定する、
- 以上a)~c)のステップを含む、体液サンブル中のヒト組織因子重順タンパク質の存在を検定する方法。
- (36)a) 請求の範囲(22)記載の抗体組成物を含有するバッケージを含むサンプル中に存在するとト組織因子重素タンパク質の存在を決定するための、キットの形をした診断システム。
- (37)上紀モノクローナル抗体分子を含む上配抗体組成物が、
 - a) TP8-5G8.
 - b) TF9-8B4.
 - c) TF9-10H10

からなる群から選ばれたハイブリドーマにより設生される、第次の範囲(36)記 載のは新システム。

- (38)a) サンブルを、請求の範囲(15)記載のポリペプチドを固体マトリックスに 固定した固体サポートと減合して、結合反応混合物を形成する。
 - b) 上記結合反応混合物を、製血因子が上記ポリペプチドと結合し、固相複合体及び上消を形成するのに十分な時間維持する。
 - c) 上記複合体から上記上積を分離する、及び
 - d) ステップc) の分離した複合体から、上記凝血因子を回収する、
 - 以上、a)~d)のスチャブを含む、サンブルから血液疑問因子短/Waを 単離する方法。
- (30) 実質的に、ヒト組織因子経験タンパク質を含まない生理学的活性のあるヒト 組織因子重類タンパク質の水溶液を含む組成物。
- (40)上記生物学的活性のあるヒト組織因子重線タンパク質を、リン肪質中に分散
- (43)む)少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、実質的にとト組織因子軽頻タンパク質を含まない、生物学的活性のあるとト組織因子重級タンパク質の水泊液を含有する組成物を含むパッケージ、

を含む血管システム液体サンブル中での凝固能を検定するキットの形をした診断システム。

- (44)上記重球タンパク質がリン脂質中に分散している、請求の範囲(43)記載の診断システム。
- (45)上記タンパク質が可容性であり、かつ、以下のアミノ酸残差配列を有する、 請求の範囲(43)記載の診断システム。

• •	10	20	30,	40
SGTTNI	YAAY	nltwxstnpx	TILEWEPKPV	NOVYTVQIST

50 60 70 80
KSGDWKSKCP YTTDTECDLT DEIVKDVKQT YLARVFSYPA

90 100 110 120 GNYESTGSAG EPLYENSPEF TPYLETNLGQ PTIQSPEQVG

130 140 150 160
TKVNVTVEDE RTLVRRNNTF LSLRDVFGKD LIYTLYYWKS

170 180 190 200 SSSGRRTART NTNEFLIDVD RGENYCPSVQ AVIPSRTVNR

210 KSTDSPÝECM GQEKGEFRE 平成 7.12.20 発行

させた、請求の範囲(39)記載の組成物。

(41)上に溶液が、非イオン性界面活性剤を含む、請求の範囲(39)記載の組成物。 (42)上記タンパク質が可溶性であり、がつ、以下のアミノ酸残基配剤を育する、 物水の範囲(39)配動の組成物。

	•		:
10	20	. 30	40
EGTTHTVAAY	nltwkstnpk	TILEWEPRPV	TRIGVTYVOUST
. 50	. 60	70	80
KSGDWKSKCP	YTTOTECDLT	DEIAKDAKOL	YLARVFSYPA
			•
90	100	110	120
GNVESTGSAG	eplyenspep	TPYLETHLGQ	PTIQSPEQVG
• ;			• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •
130	140	150	. 160
TKVHVTVEDE	RTLVRRNNTP	LSLRDVPGKD	LIYTLYYWKS
. 170	180	100	
SSSCKETART	NTNEFLIDVD	190	200
	. WINEFFIDAD	RGENYCFSVQ	AVIPSRTVNR
210			
KSTD9PVECH	GOEKGEPRE		
•			

- (46)a) ヒト組織図子重線タンパク質をコードする構造遺伝子を規定する第1のD NA断片及び、第1のDNA断片と連続しており、かつ上記タンパク質に結合する、アミノ酸残基リーダー配列をコードする第2のDNA断片で、政第1及び第2のDNA断片合せて上記タンパク質の前駆体をコードする流成構造遺伝子を規定しているDNA断片と機能的に結合する、ホ乳類細胞に適合する発現ペクターを含む組換えDNA分子でトランスホームした木乳類細胞の栄養培地での培養を開始する;
- 6)上記培養物を上記細胞が上記組換えDNA分子由来のタンパク質を発現し、かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する、そしてと)上記培養物から、上記成熟タンパク質を回収する。
- 以上、a)~c)のステップを含む、成熟ヒト組織因子重域タンパク質の関 部方法。
- (47)上配流成構造遠伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (48)配載の方法。

350 1 V K D Y K Q' T Y L A
TICTCAACCATCTCCCAC
320 330 340 34 æ T K T V A A A FINGMATACTCTCCCAC' > ~ 3 150 T D T E G D L T D E 1 NCACACACACTCTCACCTCACCCACACA1 290 300 310 CCCCAC T I Q S P E Q V G .T ACMITCACACITICACACCICCCAACA A70 480 .490 9 200 390 22 E V E TTTCCACTCGCAC 200 CTCTCTCCCTCCTCTTCCCX 2 3 N F K T L ATTICAGGGATTITC 190 K C F Y T T AAAACTTTTACACAAC Y P A C N TACCCCCAGCCAATC CTCCGACACCAA 280

(48)請求の範囲(46)記載の方法により産生した、成熟とト組織因子重幀タンパク 質を基本的に含む起成物。

(49)請求の範囲(47)記載の方法により産生した成熟とト組織因子重領タンパク質 を基本的に含む組成物。

(50)ヒト組織因子重領タンパク質及び配列: PKPY NGWTVQIST KSCDWKSKCで扱わ されるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を確生する、TF-9-5B7と 命名されたハイブリドーマ。

(51)請求の範囲(50)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノ クローナル抗体組成物。 乔 続 補 正 書 (方式)

平成 7. 3 28 月 日 |**通**|

特許庁長官 歌

1.事件の表示 昭和も3年特許職第503555号 (PCT/US88/00998).

2.免叨の名称 ヒトの組織因子に関連するDNA 断片・ポリペプチド及び抗体

3.接圧をする哲

中作との関係 - 出 類 人

120

スクリップス ノクリニック アンド リサーチ

4.代 母 人

住 所 東京都千代田区九の内3丁目3番1号 電話(代) 5211-874[

氏名 (5985) 弁理士 中 村 と

5.補正命令の日付

平成1年8月22日

8.補正の対象

明細音および請求の乾悶の期釈文

殷而の解釈文(第3、 9、10、11、12、13、14、16、17図)

7. 論正の内容

別紙のとおり

^{*}明解書、埼永の戦闘および図面の説訳文(第3、9、10、1) |13、14、16、17図)の浄彦 (内容に変更なし)

方式 (畑)

明 被 書 ヒトの組織因子に関連するDNA助片・ ポリペプチド及び坑体

(本出頭の関連文献)

本出別は、1987年3月31日に出願された米国出願第 033,047号及び1987年6月25日に出願された出願第 067,103号の部分雑統出願である。

(技術分野)

本発明は、ヒトの組織因子重額タンパク賞(huTFh)をコードする構造遺伝子を有する組織えDNA分子(rDNA)に関し、より詳細には、本発明は、宿主細胞中に含まれる、huTFhを発現しうる発現ベクターに関するものである。また、本発明はhuTFhの合成ポリペプチド類似物及びhuTFh及び徐ポリペプチド類似物と結合するモノクローナル抗体に関する。

(発明の背景)

凝血は、一類の凝集因子として知られる細胞性及び血熱性タンパク質によって仲介される、一速の、酵素、共因子、タンパク質分解及びゲル化反応のカスケードによって起こる。このカスケードの開始は、退機因子(TP)として知られる細胞性レセプターが、凝集因子で又はその読事体、因子で』と結合し、触媒的に活性のある複合体を形成したときに起こる。TPの非存在下、及び複合体への連続する結合がない場合には、個/Wak 凝集を開始しない。 従って、TPの化学的かつ生化学的特性が、凝集のメカニズムを理解する上で重要なことは明白である。

組織因子は、通常循環器中で可溶化しておらず、また、因子で ノゼョ及び他の新集因子を含む血無タンパク質と接触で含ないこ とが分っている、膜に結合した糖タンパク質である。組織因子は

混合物の界面活性利及びイオン組成に影響されると報告されている。ネマーソン(Maperson). ジャーナル・オブ・クリニカル・インペスチゲーション(J. Clin. lavest.) 4 7 ~ 7 2 頁(1968) t ネマーソン(Menerson). ジャーナル・オブ・クリニカル・インペスチゲーション(J. Clin. Invest.) 4 8 ~ 3 2 2 頁(1969 年) 及びカーソン(Carson) 等、サイエンス(Science) 、 2 0 8 色、3 0 7 頁 (1 9 8 0 年) 参照。

単離した、もしくは、解別質化したTF合有タンパク質問題物は、数キの種の組織から抽出物によって調製した。組織因子は、天然の組織中に非常に少量しか存在しないので、歴史的に使用されてきた方法は、困難で、時間もかかり、かつ低収率であった。古典的方法のレヴェーとしては、ネマーソン(Semerace) 等の報告(プログレス・イン・ヘマトシス・アンド・トロンボンス(Prog. Hem. Thron.) 6巻、237~261頁(1982年)を参照せよ。

 通常、血管を形成している細胞の表面上には発現されていないが、 血管中の単球によるその発現は、パクテリアのリポタ域のような 感染性は乳成分、ある抗原により刺激されたTへルパー細胞から 誘導され、直接的にはある刺激されたTへルパー細胞由来のリン ホカイン及び免疫資合体によって誘導することができる。例えば パクテリアのリポタ 増同様、インターロイキン1及び超極境死因 子アルファのような単細胞/マクロファージのある反症仲介物は 血球の体検側表面にTPを発現する内皮細胞を刺激することがで きる。 典型的に、血管要素におけるTFの発現は、は大する血管 内吸血又は、局部的な凝血の開始、すなわち血栓形成を起こす。

組織因子は、比較管内の協議界細胞を含む培養物中のある血管 外組版、未同定型の延細胞及び基底膜バリヤーにより、構成する 血質タンパク質から分離されている上皮細胞の表面上に構成的に 発現される。これら細胞上のTPの存在は、組織損傷の結果とし ての血液との接触でクロットを形成する。従って、TFは、凝血 システムが開始する基礎である。

ハウウェル(Bowell) (アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー(Am. J. Physiol.) 31 巻1 頁(1912年))の報告は、TPを含む単離した組織タンパク質(関型物は、リン脳質ータンパク質(リポタンパク質) 複合体として存在するときのみ恐気を促進することができることを示す最初の報告である。 典型 といっているリン脳質を除去してしまうので、単離したタンパク質を再脳質化することによるTPの概能的プロコアグラント活性の再構成が必要であることから、これら再構成の研究が多くの研究者によって行なわれて含ている。例えば、凝氣活性の回復は、リン脳質のタイプ、タンパク質に対するリン脳質の生、及び再構成

ら方法の使用は、有意量の単離14/14。を入手することの困解性 のみならず、因子14/14。の不安定性によっても期限される。

プローズ等(上記)は、huTFに特異的なモノクローナル拡 体の開発及び免疫現和性吸着体としてのそれらの使用は、因子な ノVIa使用の制限によって起こる問題を回避できることを指差し ている。しかし、統一huTFモノクローナル流体は、放文献中 には報告されていない。さらに、子牛のTFによって生じる2つ のモノクローナル流体(カーソン(Carsos)等、ブラッド(Blood)。 662巻156頁(1985年))は、huTFとは免疫反応を 起こさない(グハ(Guha)等、上記)。

(本発明の概要)

1つの監機において、本発明は、ヒトの組織因子重線(hotfa) タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わず か約12.000塩基対を含むDNA断片を考案している。接構遺 遺伝子が、第1回の約1番から約263番で示されているアミノ 数残益を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さ 6に、接構造遺伝子は、第2回の約130番から、約918番で 示されるヌクレオチド塩素配列を有することが好ましい。

望ましい戯機においては、そのDNA町片は、第1の配列の5、末端と連続し、かつ、huTPhタンパク質のフミノ末端に結合したアミノ放残器リーダー配列をコードする第2の配列をも含む。その第1及び第2のDNA配列は一緒になって、ヒトの組織因子遺蹟的駆体(プレトuTFh)タンパク質をコードする混成構造遺伝子を定義している。抜混成構造遺伝子は第1回の約つ32番から約263番で示されるアミノ酸残器を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さらに、譲渡成構造遺伝子は、第2回の約34番から約918番のヌクレオチド塩基配列を

H-SGTINTVAAYDLTWKSTDFXTILEWEPKPV-OH.

H-TKSGDWXSKCFYTTDTZCDLTDZIVKDVKQTY-OH,

H-KSGOWKSKC-OH,

H-ECDLTDEIVKDVKGTY-OH,

H-LARVESYPAGIVESTGSAGEPLYENSPETTPYLC-OH,

H-YENSPETTPYLETHLGOPTIQSFEQUETKY-OH, RO

H-QAVIPSRTVIRKSTDSPVIC-ON; RU

有することが望ましい。

別の転換において、本発明は、ヒトの組織因子重額タンパク質をコードする1つの構造遺伝子を定義する第1のDNA断片と複能的に結合したベクターを含む超換えDNA分子を考案している。さらに該超換えDNA分子は、第1の断片の5 * 末端に連続し、上記タンパク質に結合するアミノ散残基リーダー配列をコードする第2のDNA断片を含むことが好ましい。すなわち、上記の第1及び第2のDNA断片は一緒になって、上記タンパク質の前駆体をコードする混成構成遺伝子を定義している。

別の競機において、本発明は、わずか約507ミノ酸残器を含 み、かつ式

- - VNQVYT-

で表わされる配列に相当するアミノ散残器配列を含むヒトの組織 因子結合部位のボリペプチド環似物を考案している。

さらに好ましくは、本発明はわずか約507ミノ散残蓄を含み、 かつ、

- VEQUITYQIST - , AU

- LTYWESSSSKET -

からなる群から選択される式で変わされる配列に相当するアミノ 監護基を含むとトの組織因子結合部位のポリペプチド類似物を考 変している。

さらに本発明の崩壊には、

- a)ヒトの組織因子重鎖タンパク質と免疫反応する、
- b) H-EWEPKPVNQVYT-OH,

H-EPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKC-OH,

H-VFCXDLIYTLYYHKSSSSGXXT-OH.

H-ROVFGKDLIYTLYYKK-OH

H-IYTLYYWKSSSEGKKTAK-OH,

H-SSSCXXTAXTHTHEFLIDVDXGENYCFSV-OH,

また、本発明は、

- a) 生理学的に許容される希釈解及び効果的な生体内指示手段と 結合させたハイブリドーマTP9-10H10によって作られ たある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を被検等 に静脈注射により投与し、血栓中に存在するヒトの組織因子と 免疫反応させる、
- b) 該抗体分子が、血栓の一部として生体内に存在する組織因子 と免疫反応し、かつ、免疫反応動質を形成するのに十分な時間、 その投与を受けた維持者を維持する。
- c) ステップb) で生成した免疫反応生成物の存在を検定する、 以上ョ) ~c) のステップを含む、生体内で血栓を検出する方法 も考案した。

さらに、本発明は、TP8-5 C 9 及びTP9-6 B 4 からなる群から選択されるハイブリドーマにより生産され、存在するとトの組織因子と効率よく結合する、ある量の沈体分子を含む生理学的に許容される希釈剤を含有するモノクローナル抗体組成物を、被検省に静原注射によっと投与することを合む、生体内で、凝集因子 4 / 1/1 a と結合するヒトの組織因子の能力を中和する方法も考定している。

また、本発明は、因子VI/VIaと反応するのに有効な量の、

H-EHEPKPVHQVYT-OH,

H-EPKPYNQVYTVQISTKSGDWKSXC-OH,

H-VFGKDLIYTLYYWXSSSSGKKT-OH,

H-RDVFGKDLIYTLYYWK-OH

H-IYTLYYWKSSSSCKKTAK-OH, MU

H-SSSGKKTAKTHTHEFLIDVDKGENYCFSV-OH;

からなる群から選ばれるポリペプチドを含む生理学的に許容され

からなる群から選択される式で変わされるポリペプチドと免疫 反応する。

c.) 実質的に第1図の部位206から部位226で示される式で 変わされるポリペプチドとは免疫反応しない。

抗体分子を含む抗体組成物である。

また、本発明は、ハイブリドーマでP8-5G9、TP9-10H10、TP9-5B7及びTP9-6B4と、それらハイブリドーマによって生成される抗体分子を含むモノクローナル拡 体組成物を考案している。

本発明は、・

- a) 身体試料を、ヒトの組織因子重額タンパク質と混合し、免疫 反応混合物を作る、:
- b) その混合物を、抗体が、その試料中に存在するヒトの観機因子と免疫反応し、免疫反応度物を作るのに十分な時間維持する、 2.1.7
- c) ステップも) で生じた免疫反応 虚物の存在を検出する、 以上のステップを含む体液 試料中のヒトの超機因子重線タンパク 質の存在を検定する方法も考案している。

る希釈剤を含有するポリペプチド組成物を、静原注射で放復等に 投与することを含む、生体内で、ヒトの組織因子が、凝集因子型 / Vtaに結合することを限容する方法を考案している。

別の態様において、本発明は、木発明の抗体組成物を含有する パッケージを含む、試料中のヒトの組織因子重質タンパク質の存 在を検定する、キットの形をとった診断システムを考案している。 その抗体組成物は、

- a) TF8-5G9.
- b) TF9-684.
- c) TF9-10H10,
- d) TF9-5B7.

からなるハイブリドーマの母から遺ばれたハイブリドーマにより 生敗されるモノクローナル抗体を含むことが望ましい。

また、試料から血液凝集因子12/12 a を単離する方法も考案された。*

この方法は、

- a) 固体マトリックスに固定した、請求項 1 5 記載のポリペプチ ドを合む固体サポートと試料を混合することにより結合反応選 合物を作る、
- b) 上記結合反応混合物を、上記数集因子が上記ポリペプチドと 結合し、固体複合体及び上情を作るのに十分な時間、複持する、
- c) 上記複合体から、上記上清を分離する、そして
- d) ステップ c の分離した複合体から、上記凝集因子を回収する、 以上、 ») ~ d) のステップを含む。

さらに、実質的に、ヒトの組織因子経績タンパク質を含まない、 生物学的に活性のあるヒトの組織因子重績タンパク質の水溶液を 含む組成物を考案した。この生物学的に活性のあるヒトの組織因 子重領タンパク質は、リン脂質又は、非イオン性界面活性剤中に 分散されていることが望ましい。

血管系統体試料中の最無能力を検定するための、キットの影を とった体制システムも考案された。それは、実質的にヒトの組織 因子経債タンパク質を含まない、少なくとも1回の検定を行うの に十分な量の、生物学的に活性のある、ヒトの組織因子重債タン パク質の水溶液組成物を含有するパッケージを含む。その重質タンパク質は、リン脂質中に分散されていることが望ましい。

別の競技において、成熟したヒトの組織因子重額タンパク質の 調製法及びその方法によるタンパク質発現産物も考案されている。 この方法は、

- a) 栄養物地中、ヒトの組織因子重領タンパク質をコードする構造遺伝子を定義する第1のDNA断片及びその第1の断片に連抜し、かつ、上記タンパク質に付随するアミノ酸残蓄リーダー 配列をコードする第2のDNA断片と複雑的に結合し、宿主 本 乳質細胞と適合する発現ベクターで、上記第1及び第2のDNA 断片が上記タンパク質の前駆体型をコードする機成構造遺伝子を定義するものであるようなペクターを含む組換えDNA分子でトランスホームした宿主水乳類細胞の特養を節始する、
- b) その培養物を、上記額数が、上記組換えDNA分子からタン パク質を発現し、かつ、上記成熟更のタンパク質を形成するの に十分な時間維持する、そして、
- c) 上記時費物から、上記成熟型のタンパク質を回収する、 以上a) ~ c) のステップを合む。

図面の顔鼻な説明

図式は木公開の一部を形成している。

第1回は、1文字でミノ政践番コードを用い、左から右に、ア

♪ン (k) で示した見かけの分子量をもつ分子量標準物質を示している

第5回は、15%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子はノビュの観和性で単離したhuTFのオートフルオログラムを示している。huTPの早難、「ことよるラベル化及び電気泳動は、例4と間様に行った。レーンAは、DTTによる運元後の単離したhuTFを示している。レーンBは、DTT選元なして、電気泳動した同サンブルを示している。上のバンド及び下のバンド(U及びLと表示した)は、各々、約58及び47kの大きさのhuTFに対応している。オートフルオログラフィー後、上のバンド及び下のバンドを切り出し、DTTを合むSDSサンプルバッファ中で再次和し、第2の15%アクリルアミドゲルのサンブルウェルに入れ、電気泳動した。レーンCは、レーンBから得られた上のバンドの再電気泳動の結果を示している。125及び47キログルトン(k)の見かけ上の分子量をもつタンバク質が矢印で示されている。

第6回は、例4で説明されているように、まずれuTF特異的モノクローナル抗体で免疫性酸化し、ついで8~1?%のポリアクリルアミド勾配ゲルで電気泳動した、因子以/Viaの観和性で 単離したトuTFのオートフルオログラムを示している。レーン Aは、DTTによる遺元を伴う、電気泳動した¹³⁶1ラベル化 れuTFを示している。レーンBは、辺元なしで電気泳動した同 サンプルを示している。

第1回は、15%アクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子 VIVII の既和性で早難したトロTFのオートフルオログラムを 示している。早離、***!によるラベル化、還元及び肢グリコン ミノ末端からカルホボキシ末油の方向で、ヒトの組物因子質領タンパク質の成熟型及び削駆体(各々、トロTFト及びブレbeTFh)の完全なアミノ設践器配列を示している。主な天然の成熟型タンパク質のアミノ設践器配列は、1番から263器に対応する。マイナーな成熟型タンパク質の配列は、3番のアミノ放践器から始まり、263器の残器で終わる。成熟プロセスではまされるリーダー配列(削駆体領域)に相当するアミノ放験器配列は、マイナス委号で示した。細胞外ドメイン及びトランスメンブレン・アンカー領域は各々、部位3~219及び220~242に対応する。第2図は、1文字ヌクレオチド塩器コードを用い、左から右に5、末端から3、末端の方向で、ブレトロ下ドト及び外を示している。トロTPトの構造遺伝子は塩蓄130から始まり、塩蓄918で終わる。

その抗み枠は、各アミノ酸を示す1文字を、対応するコドンの 中央の塩益上に置くやり方で、メクレオチド配列の上に推察され るアミノ酸残益を付置することにより示した。

第3回は、例2で提列されている、huTPの凝血惰性を測定するのに用いる、減気検定を示す回である。同対数プロットは、 ひとミリリットル当りのピコグラムで表わしたヒトの提機因子 (huTP) 速度で示される、ヒトのクエン酸化血漿凝集(凝血) 時間を示したものである。

第4回は、10%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、 因子W/Wa観和性で早離したhuTFhのオートフルオログラムを示している。レーンAは、例4で段明されているように、単 離され、電気泳動的に、ジチオスレイトール(DTT)で還元したいようでのル化huTFを示している。レーンBは、キログル

ル化は、例4で説明されているように行った。レーン1 は、キロダルトンで扱わされた見かけ上の分子量をもつ環体物質として電気休動したタンパク質復体物質:リゾチーム、14.3 ; カルギニック・アンヒドラーゼ、30.0; オパルブミン、46.0; ウシ直清アルブミン、69.0; ホスポリラーゼも、92.5; ミオシン、200.0 (ナペて I L 出、アーリントンハイツ・アマーシャム社より入手)を示している。125! ートu TFを含むサンブルをDTT存在下 (レーン2及び3)又は非存在下 (レーン4及び5)で電気休動した。これら***! ートu TF合有サンブルのいくつかは電気休動前に放グリコシル化し(レーン3及び4)。他のものは脱グリコシル化しなかった(レーン2及び4)。

レーン3及び5に流した・・・・ I ート u TF含有サンブルは、電 気味動前に限ゲリコシル化され、レーン2及び4のものは酸グリコシル化しなかった。

第8図は、例9で説明されているように、10%のポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、免疫設和性で早期されたhalfのオートフルオログラムを示してい。レーン1は、キロダルトンで表わされる見かけの分子量をもつ、マーカーとして電気泳動した環境タンパク質;チトクロムで、124;ラクトグロブリン、184;カルボニック・アンヒドラーゼ、290;ラクテート・デヒドロゲナーゼ、360;オパルブミン、430;グルクメート・デヒドロゲナーゼ、550;及びホスポリラーゼト、955(全て、MA州ニュートンセンターのディパーシファィド・パィオテク(Diversifled Biotack)から入手した)を含んでいる。

レーン 2 は、スミス(Smith) 等のBCAタンパク質検定法 (アナリティカル・ペイオケミストリー(Amal. biochem.)150 必、76~85頁(1985年)) を用いて週定し、かつDTT

平成 7.12.20 発行

を用いて還元した約20 µ gのタンパク質を含んでいる。huTF 重額 (huTFh) は、明らかに、およそ47 M rの位置に段区 され、huTF键値は、およそ125 M rの位置にわずかに確認 された。タンパク質は、レムリ(Lecanli)(ネイチャー(Nature)、 227巻、680~685頁(1870))の報告に従がい、コ マージ・ブルー染色により可復化した。

第9回は、huTFhの非リン 監質化 (非脂質化) ポリペプチド類似物による、huTF由来の凝集開始阻害の投与一応苦曲線を示すグラフである。 様々の濃度の非脂質化ポリペプチドによる凝集阻害率は、例12に説明されているように測定した。 テストしたポリペプチドは、p26-49 (Δ TF2649)、p121-155 (O、TF121、155)、p146-167 (Φ 、TF146、167)及びp204-226 (爾、TF204、226)である。

第10回は、トロTFトのリン暦堂化した(勝堂化した)ポリベプチド類似物による、トロTF由来の最無関始阻害に関する投与・応答曲線を示すグラフである。その風客平は例9で説明されているように、同方法により、同類似物に対して規定した。

第11図は、組換えDNAプラスミドゥCTF64、ゥCTF314及びゥCTF403内のEcoRI断片挿入物の制理地図を示したものである。その挿入物(——))は、プレトuTPA選伝子の完全なダクレオチド配列に対応する重複するヌグレオチド配列領域を示している。別に、その挿入物は、第2図で示されている、残器1~486(pCTF64に含まれている)、及び残器135~775(pCTF403に含まれている)、及び残器776~1125(pCTF403に含まれている)由来のヌクレオチドに対応するスクレオチド配列を、左から右に5・から

例19に述べられているように測定した。白丸(O)はTP8-5C9抗体を示し、馬丸(Φ)は無関係の抗体を示している。

第16図は、抗TFモノクローナル抗体TF8-5GBによる 特製したヒトの属TFの凝血活性の関連を示している。リン腺質 ベンクル中に再構成された、特製したヒトの属TFの凝血活性は、 核トの適度の精製1gGと、37℃30分間、前処理した後側定 した。丸は、抗TF抗体TF8-5G9に対するもので、三角は、 無関係なコントロール抗体FAb100に対するものである。デ ータは、抗体を加えない場合の活性に対する阻害率として表わさ れている。

第17図は、特製した抗丁ドモノクローナル抗体で処理した、 培養されたJ82勝駅がん粕散に対する阻害因子はの結合及び、 その組動による因子Xェの形成を示している。因子Xェの形成率 の阻害の値は、三角で表わされ、因子VIの結合阻害の値は、丸で 表わされている。データは、抗体を加えないでインキュベートし た細胞を用いて得られる値に対する阻害率で表現されている。パ ネル人は抗体丁F9-2C4の効果、パネルBは、抗体丁F9-587の効果を示している。

現18関は、例25で述べられているような、免疫観和性で単 難した h u T P のウェスタンプロット分析を示している。15 光 ポリアクリルアミドゲルに次に示すものがかけられた。レーン1 は、キロダルトン(k)でバネル人の左に示された見かけの分子 量をもつ分子量環準が含まれる。レーン2は、電気泳動前に還元 された、複製ヒトヘモグロビン1μgを含んでいる。レーン3は、 単離した h u T P を電気泳動前に還元したもの0.5 μgを含んでいる。レーン4は、非遠元の、単鄰された h u T P 0.5 μgを含んでいる。SDS-P A G B 後、生じたタンパク質パンドを電気 3 ・の方向できんでいる。また、例 1 6 で述べられている機 * の 組換え D N A 分子を構築するのに用いられた神人物内の制限評業 切断部位のおよその位置も示されている。さらに、完全な形で示 されるリーグーペプチド (下下) 及びトランスメンブレン・ア ンカードメイン () をもつプレカ u T P h タンパク質のお よその位置も示してある。

第12図は、トu T F トの非リン設質化(非設質化)ポリペプチド銀収物による、トu T F 由来の凝集団站の阻害を示す、役与一応答曲級のグラフである。モル環度で表わした積々の濃度の非設質化ポリペプチドによる凝集の阻害率(光)は、例12に送べられているように測定した。 は敢したポリペプチドは、p24-35 (Δ)、p26-49 (O)、p152-159 (O) 及びペプチドp40~71、p72~104、p94~123及びp161189であるがこれらは全て、実質的な阻害を示さず、集物的に異丸(Φ)で示した。

第13図は、TF8-5C9 抗体組成物による最無限等の速度 給を示すグラフである。数集の阻害率 (米) は、例18で速べら れているように測定された穏々の抗体免疫反応時間にわたってプ ロットしてある。

第14回は、huTF由来の磁体の抗huTF放体による国事の投与一応告を示すグラフである。積々の慢度の抗huTFモノクローナル抗体TF8-5G9による凝集の阻害率(光)は到19に述べられているように設定した。

第15 図は、huTF運がヒトの機能等和数系列CM1381の細数破壊物である、huTF由来の破滅の、抗huTF抗体による阻害の投与一応答のグラフである。種々の濃度の抗huTFモノクローナル抗体TF8-5G9による破滅の顕著等(%)は、

発明の詳細な説明

A. 定核·

アミノ政; ここで同定される全てのアミノ政は、天然のL-型のものである。 標準的ポリペプチド命名法に従がい (ジャーナル・オブ・パイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chen.)、243 巻、3557~59頁(1969))、アミノ政残落の時号は、次の緊会表に示されているとおりである。

対 応 表

58	号	・・・ アミノ政
1文字	3文字	•
Y	Туг	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
A	Ala	アラニン
s	Ser	セリン
L	[10	イソロイシン
L	Leu	. 0122
т	Thr	スレオニン
· v	V a 1	N92 .
P	Pro	アウリン

	· _	1 7 -
К.	L ye	リジン
н	His	グルタミン
a	Gin	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
w	Trp ·	トリプトファン
R.	Arg	アルギニン
D	A ap	アスパラギン酸
N	A sp	アスパラギン
С	C ys	システィン

ここでは、全てのアミノ酸配列は、従来どおり左から右に、アミノ酸末端からカルボキシ末端への方向で示されていることに住意を要する。さらに、アミノ酸残器配列の始め又は終りのダッシュは、各々、アミノ及びカルボキシ末端のド及びOH(水素及び水酸器)のようなラジカルへの結合、もしくは、ポリペプチド頃における1から約15残器の1つ以上のアミノ酸残器配列を示している。

ボリペプチド及びペプチド;ボリペプチド及びペプチドはここでは、協合う残益のアルファアミノ遊とカルボキシル益の間のペプチド結合により互いに直鎮的に結合した、わずか約50アミノ設殊益を意味するものとして互換的に用いられている。

タンパク質:タンパク質は、ポリペプチドのように互いに直収 的に結合した50以上のアミノ改装器を意味して用いられている。

スクレオチド: 總部分 (ペントース) 、リン酸及び窒素へテロ、 順塩基からなる DNA 又はRNA の単量体ユニット。この塩基は グリコンド炭素 (ペントースの 1 ′ 炭素) を介して複部分と結合 しており、塩基と椒の退合せはスクレオシドと呼ばれる。スクレ オシドがペントースの 3 ′ 又は 5 ′ 部位に結合するリン酸基を含

パク質をコードする構造遺伝子を形成するDNA配列がDNA断 片中に含まれることが望ましい。その遺伝子はカロTFA又はプレカロTPAタンパク質中にあるアミノ破残器をコードする各コドンが中断することなく連続して存在する、すなわち、イントロンを会まない遺伝子であることが好ましい。

使って、第2回に示される、5 / 末端の約130者から、3 / 末端の約918署の部位の配列を基本的に含み、かつ、h u T P b を発現することができる D N A 断片が本発明の1 監視を構成している。第2回に示される、約34番から約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、プレ h u T P h を発現できる D N A 断片が、本発明のもう1つの触機を構成している。

好ましい、可容性のトuTFト分子は、トuTFトをコードするDNAの5、末端の約150塩基によってコードされるアミノ 放残器を欠いている。従って、第2回で示される、5、末端の約130番から約756番を極由して、3、末端の約801番の部位までの配列を基本的に含み、かつ、可溶性のトuTFトを発現できるDNA断片は、未発明のさらに好らしい超機を構成する。可溶性のトuTFト構造遺伝子を形成する、典型的な好ましいDNA断片は、第2回で示されている、約130番から約756番約130番から約801番で表わされるヌクレオチド配列を有するものである。

可溶性プレトuTFトをコードする、好ましいDNA断片は、 それらが、第1図で示されるように、 - 32番から 0番までのア ミノ改残基で示されるような、アミノ末端リーダー配列を含むタ ンパク賞をコードしていること以外は、可溶性トuTFトをコー ドしているものと同じである。従って、可溶性プレートuTFト 平成 7.12.20 発行

塩高灯(bg); 二本镇DNA分子内でのアデニン(A)とチミン(T)又はシトシン(C)とグフニン(G)の組合せ。 B. DNA斯片

生物において、タンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列は 遺伝子コードを介して、そのタンパク質をコードする構造退佐子 のデオキシリポは酸 (DNA) 配列に直接関係づけられる。従っ て、構造遺伝子は、それがコードするタンパク質又はポリペプチ ドのブミノ酸残器配列で定義することも可能である。

重要でかつよく知られた遺伝子コートの性質にリダンダンシーがある。すなわち、ダンパク質を作るのに用いられるほとんどのアミノ酸に対し、1つ以上のコードするスクレオチド・トリプレット (コドン) が、1つのアミノ酸残器をコード又は指定している。それ故、1つのアミノ酸残器型列をコードするのに多くの異なるスクレオチド配列が存在することになる。そのようなスクレオチド配列は、全ての生物において、同じアミノ酸残器配列を生産することが可能なので、線錠的には等値であると考えられている。場合によっては、ブリン又はビリミジンのメチル化物がスクレオテド配列の中に超込まれている事もある。しかし、そのようなメチル化は、コード関係にはなんら影響しない。

本発明のDNA断片は、ヒトの組織因子重複タンパク質(huTPh)をコードするDNA配列を含むという特徴をもつ。好ましい越棲において、このDNA断片は、ヒトの組織因子重質削弱体タンパク質(プレカuTPh)をコードするDNA配列を含んでいる。すなわち、本発明のDNA断片は、カuTPh、また、より好ましくは、プレーカuTPhの構造遺伝子の存在で特徴づけられる。さらに、可存性のhuTPh又は可容性のプレーカuTPhタン

をコードする構造遺伝子を形成している、好ましいDNA断片は、 高本的に、第2回で示されている5、末頃の約3~春から7 5 6 香を経由して、3、末頃の約801季で示される配列を含んでい る。典型的な好ましい可溶性のプレトロTFトコードのDNA断 片とは、第2回で示されているところの、約3~春から約7 5 6 春、約3~春から約771季、約3~春から約786番及び約 3~春から約801季のスクレオチド塩蒸配列を有するものであ る。

可得型も含めて、上記トuTFA及びアレトuTPAタンパク 賞をコードする相関的DNA及びRNAも先に組締したように考 落された。

トuTFト及びプレトuTFトをコードするDNA断片は化学的技術、例えばマテウシ(Hatteucci) 等のホスホトリエステル法 (ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー(J. Am. Chem. Soc.) 103巻3185頁(1981年))により容易に合成で含る。(ここで引用されている技術の公開に参考として超込まれている。)もちろん、コード配列を化学的に合成することにより本来のアミノ放残器配列をコードする代りに通当な塩器を用いることにより、いかなる修正も望みどおりにすることができる。しかし第2団に示されているものと全く相同的な配列を含むDNA分子の方が望ましい。

さらに、基本的に h u T F 及びプレ h u T F h タンパク賞をコードする福遠遺伝子を含む D N A 断片は、これらの退伝子を含む 組織人 D N A 分子から得ることができる。例えば、プラスミ F タイプの組織人 D N A 分子 p C T F 6 4、 p C T F 3 1 4 及びpCTF 4 0 3 はいずれら h u T F h 及びプレ h u T F h タンパク質の異なる領域をコードする D N A 区列を含んでおり、また、これらを 合せると、各タンパク質を発現するのに必要な全てのDNA配列を有することになる。各々、pCTP64、pCTF314又はpCTP403でトランスホームした大腸面の培養物は、1987年3月27日、プダペスト協定に基づき、MD州、ロックビル、パークローン、ドライブ12301番、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に保管され、各々、受理番号67370、873.68及び67369が割当てられた。

huTPh又はプレhuTPhをコードするDN人配列を含むDNA所片は、よく知られている方法を用い、先に述べた各プラスミドからの適当な制限断片を機能的に結合することにより作ることができる。典型的に、本方法で作られた本発明のDN人分子は、枯着末端、すなわちこの分子の二本領領域を越えて伴びた。突き出した。一本領領域をもっている。本発明のDN人分子上に粘着末端があることは望ましいことである。

本発明は、上述のDNA断片と等価なり求核酸(RNA)も考定している。

C, 超換えDNA分子

本発明の組換えDNA分子は、本発明のDNA断片をベクターに機能的に結合することにより作ることができる。

ここで用いられているように、"ベクター"という言葉は、細胞中で自己複製できるDNA分子で、別のDNA断片を機能的に結合することができ、その結合した断片の複製をもたらすものを意味する。huTFA及びプレhuTFA遺伝子の発現を削ることができるベクターは、ここでは"発現ベクター"と呼ばれる。従って、組換入DNA分子(r DNA)とは、天然においては通常一緒にいることはない少なくとも2つのヌクレオチド配列を含むハイブリッFDNA分子のことである。

パイオラド・ラボラトリーズ社) 及びpPL、pKK223(NJ 州、ピスカタウェイ、ファルマシア社) がある。

真体用数、好ましくは脊椎生物和数と適合する発現ベクターも、本発明の超級人DNA分子を作るのに用いられる。真核和数発現ベクターもこの分野でよく知られており、数社から市販されている。典型的にはこれらのベクターは、目的とするDNA断片の挿入に便利な制度部位を含んでいる。これらのベクターの典型的なものには、pSUL及びpKSV-10(ファルマシア社)、pBPV-1/pML2d(インターナショナルバイオテクノロジー社)及びpTDT1(ATCC.#31255)がある。

好をしい態様において、本発明の組換えDNA分子を構築するのに用いられる真核性相散発現ベクターは、真核性細胞中で効果的な選択マーカー、好ましくは、凝剤耐性選択マーカーを含んでいる。好ましい取剤耐性マーカーとは発現によりネオマイシン耐性となる遺伝子、すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo) 遺伝子である。サウザーン(Southern)等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス(J. Nol. åppl. Genet.)1 巻、327~341頁(1982年)。

本発明の r D N A を作るための、レトロウイルス発現ベクターの使用も考案されている。ここで用いられているように、*レトロウイルス発現ベクター*とは;レトロウイルスゲノムのロング・ターミナル・リピート (LTR) 領域由来のプロモーター配列を合む D N A 分子を意味する。

好ましい彪機において、真型的な発現ベクターは、真抜相物中では複製不能なレトロウイルス発現ベクターである。レトロウイルスの構築と使用法は、ソージ(Sorge) 等により報告されてい

本発明のDNA断片を機能的に結合させるベクターの選択は、この分野ではよく知られているように、例えば、タンパク質の発現などの機能的性質及びトランスホームされる宿主相散などが超換え DNA分子の構築技術の上で本質的な制限となることから、これらに直接依存する。しかし、本発明によって考案されたベクターは、これに機能的に結合しているDNA断片中に含まれる h u TF h 又はプレh u TF h 遺伝子の、少なくとも複製を、好会しくは発現をも可能にする。

好ましい館様において、本発明により考案されたベクターは、 原族性のレブリコン、すなわち、パクチリア宿主和数のような原 核細胞中の、これをトランスホームした染色体外組換えDNA分 子の自己複製及び維持を可能とするDNA配列を含んでいる。こ のようなレブリコンは、この分野ではよく知られている。さらに、 原核性レブリコンを含むこれら超様は、これをトランスホームし たパクテリア宿主に棄剤耐性を与える遺伝子も含んでいる、典型 的なパクテリアの取割耐性遺伝子は、アンピンリン又はテトラサ イクリンに対する耐性を与えるものである。

原核性レブリコンを含む、これらのベクターは、これをトランスホームした大路間のようなバクテリア存主細胞中で、Beffal
又はプレトuTFh遺伝子を発現(転写及び解訳)させることができる原核性プロモーターも含んでいる。プロモーターとは、RNAポリメラーゼの結合を許し、転写を開始させる、DNA配列でで合た発現コントロール要素である。バクテリア存主と適合するプロモーター配列の典型的なものは、本発明のDNA所片の挿入に便利な制限部位を含むプラスミドベクター中に存在する。このようなベクタープラスミドの典型的なものには、pUCS、pUCS、pBR329(CA州、リッチモンド、

る (モレキュラー・アンド・セルラー・パイオロジー(Sol. Cell. Biol.) 4巻、1730~37頁(1984年)。

相補的なホモポリマー末端を介して、DNAモベクターに限能的に結合する多くの方法が関発されてきている。例えば、相補的なホモポリマーを、挿入するDNA断片及びベクターDNAに付加することができる。それから、このベクターとDNA断片を相補的ホモポリマー末端間の水素箱合で結合し、組換えDNA分子を作る。

1つ以上の制限部位を含む合成リンカーは、DNA断片をベクターに結合するもう1つの方法を提供する。先に報告されて成したうに、エンドヌクレアーゼで制限液化することによせて交出なる。たりNA断片を、3°・5°・エンドヌクレアーゼ活性で、人間では、大口NAが片を、3°・5°・1、一大個型がある。それが、このでは、大個国DNAボリメラーゼーで処理する。それが、このでは、大個国DNAボリメラーゼーで処理する。それが、このででは、大個国DNAボリスラーゼーで、平滑末端DNAが片が生ずる。それが、のような、平滑末端DNAがデーションを触媒することができる。では、平滑で存在で、大過剰のリンカーが生ずる。ことができる。である。さらにこのDNA断片を選当なで切断に、クターとうイケーションをも

多種の制限エンドスクレアーゼ部位を含む合成リンターは、 CN州ニューヘブン、インターナショナル パイオテクノロジー 社を含む多くの会社から市販されている。

本発明は、上述の規模え·DNA分子と等価なRNAも考案して

いる。

D. トランスホームした初跑と培養

本発明は、本発明の組換えDNA分子、好定しくは可溶性のhuTFh又はプレhuTFhを発現できるェDNAでトランスホームした宿主細胞にも関連している。この宿主細胞は、原体性でも異体性でもよい。パクテリア細胞は、原体宿主細胞であることが好変しく、また典型的には、ND州ペセスグ、ペセスグ・リサーチラボラトリース社から入手できる大場間DHS株のような、大馬面の株である。好ましい真体住市主細胞には、イースト及び水乳類細胞、好変しくはマウス、ラット、サル又はヒトの繊維芽細胞系列のような脊椎動物細胞が含まれる。好ましい真体性高主細胞には、CCL61としてATCCから入手できるチャイニース・ハムスターの卵巣(CHO)細胞及びCRL1658としてATCCから入手できるNIHスイスマカス胚細胞がある。

本発明の組換え DNAによる適当な細胞宿主のトランスホーメーションは、典型的には用いるペクターのタイプに応じて、よく知られている方法により行なわれる。例えば、原族性宿主知識のトランスホーメーションに関しては、コーエン(Cobeo) 等のプロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Nati. Acad. Sci.) USA、69巻、2110頁(1972年);及びマニアチス(Haniatis)等のNY州コールド・スプリング・ハーパー・コールド・スプリングハーパー・ラボラトリー、ラボラトリー・マニュアル、モレキュラー・クローニングを参照せよ。脊椎動物細胞の「DNAを含むレトロウイルス・ペクターによるトランスホーメーションに関しては、例えば、ソーツ(Sorge)等、モレキュラー・アンド・セルラー・パイオロジー(Hol. Call. Biol.) 4巻、1730~37頁(1984

プレトロTFト抗原性を示すタンパク質、またさらに好ましくは、 生物学的に活性なトロTFトを含むことが望ましい。

トランスホームした宿主和散を培養するのに有用な栄養培地は当分野ではよく知られており、また、いくつかの販売会社より市阪されている。宿主超散が水乳質細胞であるような臆様においては、"無血清"培地を使うことが望ましい。

E、huTFh及びプレhuTFhタンパク質の生産方法

本発明の別の特徴には、 h u T P h 抗原性を示すタンパク質の 生産方法がある。 h u T F h 抗原性を示すタンパク質は天然の退 機因子によって誘導される抗体を免疫反応を起こすタンパク質で ある。 h u T P h 抗原性を示すタンパク質は、抗原として有用で あり、又、抗体を生じさせるときにも有用で、その各々が本発明 の診断システムや診断法で使用することができる。

本方法は、トロTPト又はプレトロTFト、好ましくは可容性のトロTFト又は可容性のプレトロTFトを免現することができる、本発明の超換え口NA分子でトランスホームした確主知路、好ましくは、ヒトの困路を含有する栄養培地を含む培養の開発する。この培養を、そのトランスホームした相野がトロTFトタンパク質を発現するのに十分な時間被持ずる。発現したタンパク質をその培地から回収する。好ましいがク質がした。カロTFトカタンパク質をその治性があれたトロアリンパク質はさらにトロTFトの生物学的活性すなわち、因子リンパクではさらにトロTFトの生物学的活性すなわち、因子リンスホームしたホ乳質合工を発現で含る超換え口NA分子でトランスホームしたホ乳質合工を発現で含る超換え口NA分子でトランスホームしたホ乳質合工を発現で含る超換え口NA分子でトランスホームしたホ乳質合工を発現である。その培養により、プレトロTFトタンパク質が発現し、つづいて、そのアレトロTFトタンの翻訳後の体正が起こり、生物学的に活性のあるトロTPトクン

年)、グラハム(Graham)等、ウィロロジー(Virol.), 5 2 巻、4 5 6 頁 (1973年);及びウィグラー(Wister)等、プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Matl. Acad. Sci.) USA、76 巻、1373~76 頁 (1979年)を参照せよ。

うまくトランスホームされた細胞、すなわち、本発明の退換太DNA分子を含む細胞は、従来の方法によって同定することができる。例えば、本発明のrDNAの導入から生じた細胞をクローン化し、モノクローナルコロニーを作る。これらのコロニーから細胞を収穫し、将解し、そのDNA内容物について、サウザーン(Southern)(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Hol. Biol.) 98巻、503頁(1975年)又は、ベレント(Borent)等(パイオテクノロジー(Biotech.) 3巻、208頁(1985年)によって報告されている方法を用いて、そのrDNAの存在を選べた。

rDNA存在の直接的検定に加え、成功したトランスホーメーションは、そのrDNAがAuTFA又はプレAuTFAを発現することができるときは、推来の免疫学的方法で確かめることができる。例えば、発現ベクターでうまくトランスホーメーションできた細胞は、AuTFA又はプレAuTFA抗療性を示すタンパク質を生産する。トランスホームさせた細胞状料を収穫し、本発明のハイブリドーマによって生皮される抗原等に特異的な抗体を用い、AuTFA又はプレAuTFAを検定する。

このように、トランスホームした宿主相胞それ自体に加え、本発明は、栄養培地中のそれらの細胞の培養物好をしくは、モメクローナル (クローン的に均一な) 培養物、又は、モノクローナル培養物由来の培養物も含素した。この培養物は、 hu TF h 又は

バク質が生じる。

培養物から、発現したタンパク質を回収する方法は、当分野ではよく知られたことであり、従来の生化学的方法を用い、その培養物のタンパク質含有函分の分面が含まれる。例えば、タンパク質の分面に対して知られているゲル認過法、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティ・クロマトグラフィー及びそれに鎖するものが、培養物中にある発現タンパク質の単離に用いることができる。さらに、免疫観和性、免疫吸着やそれに鎖するもののような、免疫化学的方法も、従来法を用いて行なわれる。

P. huTFh及びプレトuTFhクンパク質組成物と発現度物本発明は、また本発明のrDNAのhuTPh及びプレhuTfhクンパク質発現度物も考案している。好ましい超機において、huTFh及びプレhuTPh発現度物は第1図で示されているように、各々残器1から263及び-32から263に対応するアミノ酸残器を有している。その発現タンパク質は、第1図で示されるプレトuTFh及びhuTFhのアミノ酸残器配列の長さの少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%であることが過ましい。

別の監機において、可容型のカロTFト及びプレカロTFトと、可容性カロTFトをして、または可溶性プレカロTFトを合む組成物も考案されている。ここで用いている。可容性。という音景は、本来のカロTFト及びプレカロTFト分子の相能外ドノイン、すなわち、第1図に示すところのアミノ来協から残器220まで、の、カロTFト及びプレカロTFト分子は娘を基本的に含むことを特徴とするカロTFト及びプレカロTFト分子を意味する。それゆえ、可容性カロTFト及び可容性プレカロTFトは、本来の分子で形成されるトランスメンブレン・アンカー領域の変質的部

分(第1回で示すところの残器220から242)を含まない。 ここで用いている。huTPh。及び、プレhuTPh。という 言葉は今後特にことわらないかぎり、そのタンパク質の可容型を 含んでいる。

可得性の h u T P h 及び可溶性 アレ h u T P h は、酸水的なトランスメンプレン・アンカー領域を含んでいないので、これらは、生理学的に許容される水溶液中で実質的に凝集することはない。それゆえ、可得性の h u T P h 及び可溶性の プレ h u T P h は、存在する h u T P h 及はプレ h u T P h タンパク質の少なくとも約70%、好意しくは約80%、そしてより好更しくは約90%(重量パーセント)が非疑策(単量体)型であり、タンパク質機度的 0.1.p g / m 4 から約100 n g / m 4 の生理学的に許容された粉釈剤を用いた水溶液を作りうることを特徴とする。タンパク質溶液中に存在する凝集量の測定法は、当分野ではよく知られているところであり、抑除カラムクロマトグラフィーによるサイズ分面を含んでいる。

好ましい可得性トロTPトタンパク質は第1回で示されているところの、アミノ末端の残益的1番から、209番を経由してカルボキン末端の残益224番で示されるアミノ放残益を示している。 従って、好ましい可給性トロTPトタンパク質は第1回で示すところの約1番から約209番、約1番から約219番及び約1番から約224番の残益で表わされるアミノ設残益配列を有するものである。

好ましい可溶性プレトロTFトタンパク質は、第1回で示すと ころの、アミノ末崎の~32番から、209番を経由して、カル ボキシ末崎の224番の残器で表わされるアミノ放残器を有して いる。従って、好ましい可容性プレトロTFトタンパク質は、第

下、血管系液状サンプルを凝集する能力を意味する。磁楽能力を 検定するのに十分な、典型的 h u T F h タンパク質機度は、例 2 におけるサンプルノ h u T F h 比と同じ比を用いたとき、約 0.1 p g / m g から約 1 0 0 n g / m g、好ましくは、約 1 p g / m g から約 1 0 p g / m g、そしてより好ましくは約 1 0 p g / m g か ら約 1 n g / m g である。もちろん、磁集能力を検定するときに 必要な濃度よりも高い濃度であるが、好ましい温度に分取しうる h u T F h 溶液も考慮されている。

好ましい態様において、huTFh含有水溶液は、リン脂質又は非イオン性昇面活性剤中に分散されたhuTFhを含んでいる。 典型的リン脂質:huTFhタンパク質重量比は、約5:1から 12000:1、好ましくは、約50:1から約5000:1そ してさらに好ましくは、約100:1から2500:1の範囲で ある。

C. ポリペプチド

本発明の各ポリペプチドは、せいぜい約50個、より通常には 約35個以下の、そして好ましくは約25個以下のアミノ政残器 を含んでおり、かつ、少なくとも10個の残器を含んでいる。さ らに、本発明のポリペプチドは、そのアミノ放残器配列及び新し い母能特性を特位としている。

従って、本発明のポリペプチドの1つの駐撲は、血液凝集因子 W/VIsへのhuTFhの結合を競合的に阻害する認力をその特 散の1部としている、huTFh結合部位ポリペプチド類似物で ある。本発明の結合部位類似物は活性化した複合体を作ることな く、すなわち、砂葉を開始することなく因子VI/VIsに結合する ことが夢言しい。

ここで用いている。複合体。という言葉は、抗原-抗体又は、

平成 7.12.20 発行

1 図で示すところの約-32番から214番、約-32番から 219番、及び約-32番から約224番の残器で変わされるアミノ放残器配列を有するものである。

1つの起棟において、huTFh及びプレhuTFh発度物は グリコシル化されていない。すなわち、それらは、本発明のrDNA でトランスホームした原核細胞中で生度される。

非グリコシル化型のhoTPh及びプレhuTPhは、本発明の接種物及び診断システムにおける免疫原及び抗原として有用である。

典型的には、真核細胞で生度された h u T P h 及びプレhuTFb はグリコシル化されており、また抗原性及び免疫原性に加えて、生物学的活性を育する。ここで用いられているように、"生物学的活性"という時句は、因子W J V W a の依存の凝集を誘導する能力をもつh u T P h 又はプレh u T P h タンパク質又はポリペプチドを指して使われる。

このように、本発明は、実質的にヒトの組織因子軽額タンパク 質を含まない生物学的に活性なAuTPAを含有する水溶液を含 む組成物を考案している。その組成物も実質的に例えばラウリル 確設ナトリウム等のイオン性界面活性剤、ポリアクリルアミド及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) で満定される約、15000ダルトン以下の見かけの分子量を有 する組織由来のタンパク質のような物質を含まないことが宴まし

水得性のhuTFA含有溶液は血液又はクエン酸化した血質のような血液由来の虚物のような血管系液状サンプルの凝集能力を 検定するのに十分な生物学的に活性のあるhuTFAを含んでいる。 な異態力・という語句は生物学的に活性なhuTFA存在

レセプターーリガンド反応のような特異的結合反応の度物を意味 している。代表的複合体としては、免疫反応度物及びここでTFI VI/VIaと示されているところの組織因子一因子VI/VIa 結合反応度物がある。

好ましい態機において、huTFh結合部位領似物は、少なく とも第1図に示されている30~35番のフミノ酸残器を表わし ている次に示すアミノ放残器配列;

- TYVQVYT-

を含んでいる。・

さらに好ましくは、 h u T F h 結合部位質似物は、少なくとも、 次のフミノ酸残器配列:

- VNQVYTVQIST-及び
- LYYWKSSSSCKKT-

のうちの1つを含んでいる。

これらの配列は、第1図で示すところの各々、30~4.0及び 155~167番の、huTFhのアミノ登残器を示している。

さらに一層好ましい場合は、Au TP A 結合部位類似物は第1 図で示すところの、各々26~49番及び146~167番で表わされている、次のフミノ放残器配列;

- EPKPYHQVYTVQ I STRSGOWKSKC . AU
- ALCKOFLAIFAAKK2222CKK1 '

からなる群から選ばれたアミノ酸残基配列を含む。

好ましい h u T P h 結合部位 ポリペプチド類 関物は第1次で示されているアミノ設殊器配列を含んでいる。

第18

名 称•	アミノ政務器配列
p24-35	H-EWEPKPVIIQVYT-OH
p25-49	H-EPKPVNQVYTVQISTKSCD#KSKC-OH
p144-159	H-RDVFCKDLIYTLYYKK-OH
p146-167	H-VFGKDLTYTLYYWKSSSGXKT-OH
p159-169	H-IYTLYYWKSSSSGKKTAK-OH
P157-169	H-YWKSSSGKKTAK-OH
p161-189	H-SSSCKKTAKTHTHEFLIDVDKGENYCFSV-OH
-	

a. 各ポリペプチドの実験名は第1図の、含まれているアミノ 酸残益配列を変わしている。

ポリペプチドゥ26~48、ゥ148~187及びゥ161~ 1896、抗トロTPト抗体分子がカロTFトに結合するのを中和(競争的阻害)する能力を特徴としている。抗トロTFト抗体のトロTFトへの結合を中和する能力をもつ本発明の他のポリペプチドは、第2表に示されているものである。

第 2 表

· 4 4 アミノ酸養基配列 p1÷30 H-SCTTHTVAAYHLTWESTHIKTILEWEPKPV-OH p40-71 H-TKSGDWKSXCFYTTDTECDLTDEIVKDVXOTY-ON p41-49 H-KSGDWKSKC-ON p56-71 H-ECDLTDEIVKDVKOTY-ON H-LARVESYPAGNVESTGSAGEPLYENSPETTPYLC-OH p72-104C H-YELSPETTPYLETILGOPTIOSFEOVGTKY-OH p94~123 H-QAVIPSRTVNRKSTDSPVEC-OH p190-209

実験名に付けられた。C は、タンパク質結合のためのリンカーとして、示されている配列に付け加えられたシスティ

れる。リンキングに使われる真型的アミノ酸残器は、チロシン、システイン、リジン、グルタミン酸及びアスパラギン酸とそれに 類するものである。さらに、本発明のポリペプチドは、末端38。 基アシル化、例えばアセチレーション又はチオグリコン酸アミデーション、ターミナルカルボキシアミデーション、例えば、アン モニア、メチルアミン、その他により配列が推動を受けていることで、天然の配列とは異なることがある。

キャリャー・ハブテンのように、当分野でよく知られているリンカーを介してのキャリヤーとの結合の場合、本発明のポリペプチドは、カロTF h と免疫反応する抗体を誘導することができる。免疫学的な交差反応性の明白な原則からみて、本発明は、第1表及び第2表で示されているポリペプチドの流脈的に関連したパリアントも考案している。 抗原的に関連したパリアント とは、第1 表もしくは第2 表のポリペプチドの、少なくとも6個のアミノ酸残益配列領域を含み、かつ、第1 表又は第2 表のポリペプチド及び h u TF h と免疫反応を起こす抗体分子を誘導することができるポリペプチドのことである。

また、ポリペプチドがリン脂質又は非イオン性界面活性剤中に分散した、 h u T F h 結合部位ポリペプチド類似物の水性溶液を含む組成物を、本発明は考案している。 典型的なリン脂質:ポリペプチド重量比は、約5:1から200:1、好ましくは約30:1~80:1、さらに好ましくは、約45:1~55:1の範囲にある。リン脂質中に分散して使用するのに通している好ましいh u T F h 結合部位類似物をセクションI の第4 表にリストした。

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドの分野ではよく知られ ているいくつかの方法で合成することができる。使用しうる多く で技術のすぐれたまとめは、J. N. スチワード (Staward) 及び ン残益を示している。 .

本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドが因子は/いっへの結合に対し、本来の組織因子と観合でき、そして、または、huTPhに対する抗huTPh抗体分子の結合を競合的に 阻害しつるかぎり、huTPhのアミノ酸残器配列と同一である必要がないことを理解すべきである。それ故、本ポリペプチドは、使用する際に有利となるような、保存的、非保存的にかかわらず挿入、欠失及び置換のような種々の変化を与えることができる。

保存的電換には、あるアミノ放残器が他の生物学的に関係の残器に置き換ったものである。保存的関係の例には、イソロイシン、パリン、ロイシン又はメチオニンのような高水的残器間の電換又は、アルギニンとリジン、グルクミン数とアスパラギン数又はグルタミンとアスパラギン及びそれに領するもののような医性残器間の置換がある。また「保存的関係」という語句には、もし、ポリペプチドが、必要とされる路合活性を示すならば、未置換の元々のアミノ設の代りに、置換されたアミノ酸を置いることも含まれる。

本発明のポリペプチドが、1つ以上の保存的、もしくは非保存的置換をしているために、本来のhuTPhの配列と同一ではない場合、本発明のポリペプチドがラベル又は固体マトリックス、又はキャリヤーにうまく固定する。リンカー。を提供する目的で、その各末端に付加的残蓄をつけ加える場合は別にして、アミノ酸残蓄の通常せいぜい約20パーセント、より普通には、せいぜい10%が置換している。本発明のポリペプチドと共に使用されるラベル、固体マトリックス及びキャリヤーは以下に述べる。

通常、アミノ酸残器リンカーは、少なくとも1級器であり、また40以上の残器のこともあり、しばしば1~10残器が用いら

別の態機において、本発明のポリペプチド又は、その抗原的に 関連したパリアントは、生理学的に許容しうる水性特象利組成物 として、その効果的量が投与された時、huTFhと免疫反反応す る抗体を誘導することができる複種物となる。種々の文法型の ・接種物。という語は、huTFトの調料に開いられる活性成分として、本発明のポリオンチドを含む組成物として、ここで使用されている。ポリペプチドを含む組成物としていられるとき、そのポリペプチドは、単独で、又は結合をとして用いられるのであるが、表現の個便性のため、本発明のポリペプチドの種々の娘はは、金て、・ポリペプチド・という語及びその種々の文 た型で呼ばれていることを理解されよう。

約35以下のアミノ改残法を含むポリペプチドに対し、すでに 記されているように抗体生産の誘導のためには、キャリヤーに結 合したペプチドを使用する方が望ましい。

すでに記してきたように、1つ以上の付加的アミノ政残るをポリペプチドのキャリヤーへの結合を助けるため、そのポリペプチドのフミノ又はカルポキシ末端に付加することができる。ポリペ

平成 7.12.20 発行

プチドのアミノ又はカルボキシ末端へ付加したシスティン残益は、ジスルフィド結合を介して、結合体を作るのに特に有用であることが分っている。しかし、結合体を調製の当分野でよく知られている他の方法も使用しうる。代表的付加結合法にはミカエル付加反応度物、グルタルアルデヒドのようなジナルデヒド(クリプスタイン(Klipatein)等(ジャーナル・オブ・インフェクシャスデシーズ(J. Inpact. Ols)、L47巻、318~3.26頁、(1983年))及びそれに類するものの使用、又は、キャリヤーに対し、アミド結合を生ずる、水溶性カルボジィミドの使用ような、カルボジィミド法の使用が含まれる。活性官能活を介してのタンパク質の結合については、オーラメアス(Aurameas)等のスカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Scand. J. Immonol.)8巻、補1、7、7~23頁(1978年)を参照せ

有用なキャリヤーは、当分野ではよく知られており、一般的にはタンパク質ぞのものである。そのようなキャリヤーの代表例としては、キーホール、リンペット、ヘモシアニン(KしH)、エデスチン、チログロビン、子ウシ血情アルブミン(BSA)やヒト血律アルブミン(HSA)のようなアルブミン類、ヤギ赤血球(SRBC)のような赤血球類、テタナストキソイド、コレラトキソイド、ポリ(Dーリジン:Dーグルタミン設)のようなポリアミノ政及びこれに類するものがある。

キャリヤーの選択は、その接種物の最終的使用法に依存してお り、本発明に特に関係しない基準に基づいている。 樹えば、接種 される動物中で不都合な反応を起こさないキャリヤーが選択され るべきである。

本発明の接種物は、典型的には、キャリヤーに結合した結合物

びイムノグロブリン分子の免疫学的に活性な領域すなわち抗体結合部位又はパラトープを含む分子を意味する。代表的抗体分子には、本来のイムノグロブリン分子、実質的に本来のものと同じイムノグロブリン分子及びFab、Fab、、F (ab、)。及びF(v)として、当分野で知られている領域を含む、パラトープを含有する、イムノグロブリン分子の一部がある。

本発明の抗体組成物は、huTPh及び本発明の特異的ポリペ ブチドの少なくとも1つと免疫反応を起こす抗体分子を含むこと を特徴とする抗ペプチド抗体である。

例えば、huTFh及び組織因子結合部位のポリペプチド類似物と免疫反応する抗体分子を含む、本発明の抗体組成物は組織因子が因子リノリュと結合する能力を中和できる。従って、好きしい抗体組成物は、huTFh及びp26-49又はp146-167と反応し、かづ、p204~226と実質的に免疫反応しない抗体分子を含むものである。huTPhに対して生ずるポリクローナル抗血液は、p204-226免疫反応する抗体を含むことに住意すべきである。このように、抗204-226免疫反応性水実質的にないことが、本抗体組成物と従来の報告されているものとを区別する特性となっている。

本発明の抗体組成物の典型的生産は、水乳動物を、本発明の接種物で免疫化し、適当なポリペプチド免疫特異性を有する水乳類抗体分子を誘導することによって行なわれる。 さらに、その抗体分子をその水乳動物から収集し、例えば、免疫アフィニティ・クロマトグラフィーのような世来技術によって、その必要量を早離する。このように生産した抗体組成物は、なかんずく、体断法及び身体サンプルにおけるトuTPトを使出するための、本発明のシステムで用いることができる。

として、効果的な免疫原量の本発明のポリペプチドを含む。他の 事項の中で、単位投与量当りの効果的なポリペプチド量は、当分 野ではよく知られているように、接種される動物種、その動物の 体質及び選択した接種レジメンに依存する。與型的に、接種物は、 接種(投与)当り約10マイクログラムから約500ミリグラム、 好ましくは、約50マイクログラムから約50ミリグラムのポリ ペプチドを含んでいる。

本発明の接種物に用いられている。単位投与。という語句は、各ユニットが、必要とする希釈剤、すなわち、キャリヤー又はビヒクルと共に望ましい免疫原的効果を達むのに必要な予め決められた量の活性物質を含む、動物に対する1回の投与に通したも理的に分離した単位を意味する。本発明の複種物の新しい単位投与に関する明相は、回活性物質の独特な特性及びその独自の免疫学的効果、及び励ここで幹細に公開されている動物中での免疫学的使用に内在する制限により説明され、かつ直接依存しており、これらが本発明の特徴となっている。

典型的には、接種物は、水、食塩水又はリン酸酸街食塩水など の生理学的に許容された(受容できる) 希釈剤中にボリベプチド 一結合体を分散させることにより、乾燥した固体のボリベプチド 結合体から水性組成物を顕繋することができる。

また、接種物は特収剤の一郎として、アジュパントを含んでいる。完全フロイントアジュパント (CFA)、不完全フロイントアジュパント (IFA) 及びミョウパンのようなアジュパンドは、当分野ではよく知られており、いくつかの会社から市販されてい

1. 抗体及び抗体組成物

· 種々の文法型の"抗体"という語は、イムノグロブリン分子及"

モノクローナル抗体組成物も、本発明で考案されている。後出限界内で、モノクローナル抗体組成物は、効果的に A u T P h を結合しうる、唯一種類の抗体結合部位を含んでいる。従って、異型的に、本発明のモノクローナル抗体組成物は、それがh u T P h 以外のタンパク質を結合できる抗体をたとえ含んでいたとしても、 A u T P h への結合親和性を示す。ひとつの拡横において、モノクローナル抗体組成物は、 A u T P h 及び、組織因子結合部位のポリペプチド類似物、好ましくは p 2 5 ~ 4 9 又は p 1 4 6 ~ 1 6 7 と免疫反応する抗体分子を含んでいる。

他の類様において、本発明は、huTFhと免疫反応し、 huTFhにより開始する職業を図書する抗体分子を含む抗凝集 (中和) MoAbを考案した。さらに凝集を図書する好ましい MoAbは本発明のポリペプチド、好ましくは、huTFh結合部 位ポリペプチド類似物、及びさらに好ましくは、第1表で示され ているポリペプチドと免疫反応することを特徴とする。

他の監視において、抗凝集MoAbは、huTPh及びhuTFh: 因子MIIの複合体と免疫反応し、huTFhによって開始する凝集を阻害(中和)する抗体分子を含んでいる。さらに、好家しい抗凝焦MoAbはhuTFhポリペプチドp1-30又はp26-49と免疫反応することを特徴とし、またこれは、huTPhポリペプチドp56-71と免疫反応しないことが好ましい。

また、本発明は、組織因子の凝集を開始する能力を中和しない 派体分子を含む非中和性モノクローナル原体組成物も考案した。 そのような組成物は、 h u T F h 及びポリペプチドゥ! - 3 0 と 免疫反応し、かつ、ハイブリドーマT F 9 - 1 0 H ! 0 により生 盛 (分泌) される原体分子を含むことが望ましい。

本発明のモノクローナル抗体組成物は、適当なポリペプチド符

異性をもつ抗体分子を分泌するハイブリドーマを含有する栄養培 地を含む、モノクローナルハイブリドーマの培養を開始すること によって生成することができる。

このハイブリドーマが培地中に、その抗体分子を分泌するのに 十分な条件及び時間、培養を維持する。 それから、抗体合有培地 そ収価する。さらにこの抗体分子を従来法により単穏する。

これらの組成物の調製に有用な培地は、当分野ではよく知られておりまた、市販されていて、合成培養培地、同血铵期程マウス及びそれに類するものが合まれている。代表的合成培地は、4.5 g/8のグルコース、20 mグルタミン及び20 Mウン胎児血液を補足した、グルベコ長小培地(DMBM:ダルベコ(Bolbecco)等、ヴィロロジー(Vivol)、8巻、396頁(1959年))である。代表的同血繁殖マウス株はBolb/cである。上述の方法で生産したモノクローナル依体組成物は、例えば、huTPh合有免疫反応の形成が必要である、は断及び治療法で用いることができる。

1.ハイブリドーマ

本発明のハイブリドーマは、カロTFトと免疫反応する拡体分子を生度することを特徴とする。さらに、好をしいハイブリドーマは、カロTFトで開始する破集を阻害し、また、望ましくは、本発明のポリペプチド、好支しくは、ガロTPト結合部位ポリペプチド類似物、そしてさらに好ましくは、第1表に示されているポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生座することを特徴としている。さらに好ましい賠償においては、抗凝集MoAbは、非ヒト、電品額、TFと免疫反応する。

他の好ましい態線において、本発明のハイブリドーマはbelfh 及びhuTPh:因子はノザッの複合体と免疫反応し、buTFh

Waa複合体形成透度の被少によると考えられている。従って、生体内において、huTPh因子W/Wa結合部位ポリペプテド類傾物の投与は、磁無やある炎症反応のような、退機因子の因子W/Waへの結合により開始する生理学的応答を調節するのに用いることができる。好ましい態機において、このポリペプチドは、先に述べたように、リン設質中に分散して投与される。

生体内における組織因子による因子リノWanの結合を興奮する他の方法は、本発明の抗体組成物(抗ベプチド抗体)又は抗凝無MoAbの効果量を静脈注射により投与することである。この抗体分子は、バラトピック領域を含み、かつイムノグロブリン分断片F(ab')。、Pab及びそれに関するもののような、Fc 領域を含まないものである。治療的に効果的量の抗凝集MoAbは、体重を当り15ggから5g、好ましくは体重を当り、約100μεから約1g、より好去しくは、体重を当り約150μεから約500μεの範囲である。

他の庭様において、本発明のMoAb、抗磁集MoAb又は非中和性MoAbの抗体分子を抗腫瘍状薬に結合し、抗腫瘍治療組成物が作られる。このようにして作った、効果量の抗腫瘍治療組成物を、その表面に組織因子を発現する腫瘍相応を有する被検者に投与することができる。このような腫瘍相応の代表例は、胸及び肺のがん細胞である。

(Trends in Biotech.) 4巻、259~264頁(1986年)) により報告されている。 平成 7.12.20 発行

により別站する森集を中和する抗体分子を生産する。さらに、 トuTPh:因子はノUsの複合体と免疫反応するハイブリドー マ生 度抗体は、 該抗体の、 huTPhポリペプヂドロ1-30又 はp26-49、 好宝しくはその河方と免疫反応し、かつ、より 好宝しくは、 該抗体分子が、ポリ huTPhポリペプチドロ56 -71とは免疫反応を起こさないことを特徴としている。

型点しい免疫特異性を有する、すなわち、特別なタンパク質をして、またはポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生困する (分泌する) ハイブリドーマの作成法は、当分野ではよく知られている。特に、ニマン (Himan) 等により報告されたハイブリドーマ技術は (プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Pvoc. Nati. Acad. Sci.) USA、80巻、4349~4353頁 (1983年))、有用である。好ましいハイブリドーマを、例130第5表に示した。

ハイブリドーマ将要物TF8-5C9、TF9-6B4及びTF9-10H10はブタペスト協定に促がい、1987年3月27日ATCCに保管され、各々受理委号、HB9382、HB9381及びHB9383が割当てられた。

K. 治療方法及び組成物

本発列のトロTFト図子以/VIIIの結合部位ポリペプチド質似物、抗体組成物、モノクローナル抗体組成物及び抗凝無MaAbは各々、生体内において、組織因子による因子VI/VIIの結合を調整するのに用いることができる。

例えば、huTFh因子U/VIaの結合部位ボリペプチド類似物は、効果量を被検者に投与したとき、因子VI/VIaの組織因子への結合を触令的に関密することができる、医療的に許容しうる組成物に用いることができる。この阻害は、組織因子一因子VI/

投与されたポリペプチド又は抗体分子含有組成物は、溶液又は サスペンジョンの形をしているが、ポリペプチドは、錠剤、丸類、 カプセル、放出持続観剤又は粉末の形もとる。どの場合にも、こ の組成物は、0.10%~95%、好ましくは、25%~70%の 活性成分を含んでいる。

活性成分としてポリペプチド又は抗体分子を含む治療組成物の 類似は、この分野ではよく知られている。 典型的には、この分野ではよく知られている。 典型的には、可能な 超成物は、被体溶液又はサスペンジョンのような性計可能な形 に類似されるが、性射別の液液を入て、このでは、 連している固体形としても、この活性治療成分は、しば、 医療的に内容である。この活性治療成分は、しば、合する。 では、、かつ、活性成分に強をする、形対トロ、この は、、発力によった。 ななが、デキス びこの 組合 がよびこのがある。 たい 類として れらに 類として れるの は、加温利又はエマルジョン化剂、 印段訪別のような、 活性成分 の効果を促進する補助物質を少量含ませることも可能である。

ポリペプチド又は抗体分子組成物は、中和した医原的に受容し うる場の形に調整することもできる。医原的に受容しうる塩には、 設付加塩 (ポリペプチド又は抗体分子の遊却しているアミノをで 形成される) 及び、例えば、塩酸又はリン酸のような無機酸又は、 砂酸、シュウ酸、循石酸、マンデル酸のような有機酸及びこれら に減するもので形成されるものがある。遊離したカルボギャンル で形成する塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニクム、 カルシウム又は映の水酸化物のような無限塩杏及びイソプロビル アミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエクノール、ヒス チジン、プロカイン及びこれらに領するもののような有機塩 ら鉄道される。

治療用の思りペプチド又は抗体分子含有組成物は例えば、単位 投与量の注射によるように、局所的に又は静脈注射により層便に 投与される。

本発明の治療組成物に対して用いられる。単位投与。という語 句は、ヒトに 1 回投与するのに適した、必要とされる希釈剤、す なわち、キャリヤー又はピヒクルと共に、愛ましい治療効果をあ げるために計算された、予め決められた量の活性物質を含む、物 理的に分離されている単位を意味する:

拡組成物は、役与物形状に適した方法で、治療的に効果的な量が投与される。役与される量は処置される検体、活性成分を利用する検体の血液凝集システムの容量及び窒虫しい組織因子結合能の阻害又は中和度に依存する。投与される必要のある活性成分の特定な量は、医師の診断に依存し、かつ、各個人によっても異なる。しかし、適当なポリペプチド投与範囲は、1日に、患者当り、1から5ミリグラムの活性物質というオーダーであり、役与の経神に依存する。第1回投与及び二次免疫の適正な治療計算もいろいろであるが、典型的には、一次役与後、1時間以上の関係をおいて、さらに注射又は他の方法による投与が繰り返えされる。別に、血液中、10ナノモル濃度から10マイクロモル濃度を維持するのに十分な、投続的診察注入注も考案されている。し、診断システム

本発明のキット型の診断システムは、少なくとも1回の検定に十分な量の、分包は測として、本発明の発限タンパク質ポリペプチド、抗体組成物又はモノクローナル抗体組成物を含んでいる。 また、この分包試取の使用幾明書も含まれているのが普通である。

與型的に、"使用説明書"には、試棄護度には、混合する試棄

イエノロジー (Scand. J. Janunol.) 8巻、補版7巻、7~23 頁 (1978年)、ロッドウェル (Rodvell) 等の、パイオテクノロジー (Biotach.)、3巻、889~894頁 (1934年)及び米田特許第4,493,795号参照。

また、な断システムは、好ましくは分包の、特異的試棄を含む。 "特異的結合試棄"は、本発明の試棄を選択的に結合できる分子 であるが、本発明のタンパク質発現産物、ポリペプチド又は抗体 分子ものものではない。代表的な特異的結合試棄は、抗体分子、 補体タンパク質又はその断片、タンパク質人、血液凝集因子物/ 切っ、子クシ組織因子及びそれに質するものがある。この特異的 結合試棄は、反応物が複合体の一部として存在するとき、これと 結合することが望ましい。

好ましい態懐において、特異的結合試測はラベル化される。しかし、その診断システムが、ラベル化されていない特異的結合試 頂を含むとき、典型的には、この試現は、増市手段又は試棄として用いられる。これらの態様において、このラベル化した特異的 結合試取は、この増市手段が、反応複合有複合体に結合している とき、この増市手段に特異的に結合することができる。

本発明の診断キットは、血清、血無又は尿のような体液サンプル中のbuTFhの存在又は量を検出するのに、イライザ、方式で用いることができる。、イライザ法、は、サンブル中に存在する抗原又は抗体量を検出及び定量するための、固相に結合した抗体又は抗原及び酵素一抗原又は酵素一抗体結合物を用いた、砂素結合免疫吸着検定法のことである。イライザ法の説明は、全て参考としてここに組込まれている、1982年、CA州ロサンゼェルスのラング・メディカル、パブリケーションから出版された、D. P. サイツ (Sites) 等の基本的及び臨床的免疫学、第4編、

平成 7.12.20 発行

とサンブルの相対量、試剤/サンブル混合物の雑貨時間、温度、 パッファ条件及びそれに鎖するもののような、少なくとも1回の 検定法のパラメーターを明確に記述してある。

好ましい起機において、さらに、本発明の参照システムは、試 現を含む複合体の形成を知らせるラベル又は指示手段を含んでい 。

ここで用いられているように、種々の文法型の。うべル。及び "指示手段"は、複合体の存在を示す検出可能な信号を度み出す のに連接又は間接的に関連する単一の原子及び分子を室味する。 "生体内" うべル又は指示手段とは、被検着の体内で有用なもの である。どのうべル又は指示手段と、本発明の依体又はモノクローナル依体組成物の一部である依体分子、発現したタンパク質、 又はポリペプチドに結合又は組込まれていることもあるし、また 別々に使用されることもあり、また、これらの原子とは分子なうべ ルは、欧珠的診断化学においては、よく知られているものであり、 それらが、他の新しいタンパク質、 それらが、他の新しいタンパク質、 それらが、他の新しいタンパク質、 それらが、他の新しいタンパク質、 それらに使用されるときに関り、本発明の一部を構成する。

ラベルの結合、すなわち、ポリペプチド及びタンパク質のラベル化は、当分野ではよく知られている。例えば、ハイブリドーマによって生産される抗体分子は、培養培地中の成分として与えられたとき、放射性関位元素含有アミノ酸の代別的取込みによるラベル化が可能である。例えば、ガルフレ(Galfre)等の、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Meth、Eszymol.)73巻、3~46頁(1981年))参照、活性化官能基を介するタンパク質の結合又はカップリング技術は特に有用である。例えば、オーラメアス(Aurannas)等の、スカンジナピアン・ジャーナル・オブ・

第22章及び米国特許第3,654,090号、第3,850,752号及び第 4,016,043号に報告されている。

このように、好ましい転換において、本発明の発現したタンパク質、ポリペプチド又は抗体は固相マトリックスに固定され、この珍断シスチム中に、分包されている固体サポートを形作ってい

典型的に、この試験の固体マトリックスの固定は、他の固定法もあるが、この分野でよく知られている水性媒体からの吸着が用いられている。

有用な固体マトリックスは、当分野でよく知られている。このような物質には、ファルマンア・ファイン・ケミカルズ社 (NJ州、ビスカタウェイ)から、セファデックスという登録 高ほで市販されている、深橋デキストラン:アガロース: 1 L州、北ンカゴ、アポット・ラボラトリーズ社から市販されている直径約1ミクロン〜約5ミリノートルのポリスチレンに一ズ;シート状、ヒモ状又はへラ状のポリ海化ビニルポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロース又はナイロンベースの積物、又は、ポリスチレン又はポリ塩化ビニルでできているチューブ、プレート又はマイクロブレートのウェルが含まれる。

ここで述べられている診断システムの試取、ラベル化結合試取 又は、増巾試取は、液体分散物として溶液として、又は、例えば、 連結乾燥型のような、実質的に乾燥粉として提供される。指示手 段が酵素である場合、この酵素基質も、システムの別の包むに提 供される。先に遠べた、マイクロプレートのような固体サポート 及び1つ以上のバッファも、この診断検定システム中に別にパッケージされた要素として含まれている。

診断システムに関連して、ここで環論されているパッケージは、

は断システムにおいて通常使われるものである。このようなパッケージには、ガラス及びプラスチック製の(例えば、ポリエテレン、ポリプロピレン及びポリカーポネート)ポトル、パイアル、プラステック及びプラステックホイルでラミネートした外級物及びこれらに領するものが含まれている。

n. 検定法

本発明は、本発明の抗体又はモノクローナル抗体組成物中に含まれている、発現されたタンパク質、ポリペプチド又は抗体分子を含む複合体を生産することにより h u T F h を検出する方法を考定した。当業者には、これらの複合体を形成するのに利用できる多くの、よく知られている匹定的計断の化学手段があることが理解できよう。使って、典型的検定方法がここで説明されているが、これは、本発明を制限するものではない。

1. 南接接出

被検者中に存在する血栓検出法が考案された。生体内での指示 手段と結合する抗体を含む本発明の、効果的量のモノクローナル 抗体組成物を、被検者に静脈性射する。好ましい照極において、 ラベル化した抗体は、 h u T F h 及び第1 表及び第2 表のポリペ プチドと免疫反応するが p 2 0 4 ~ 2 2 6 とは反応しないもので、 好ましくはハイブリドーマT F 8 ~ 5 C 9、T P 9 ~ 6 B 4 又は T P 9 ~ 1 0 H 1 0 から生産されたものである。

それから被検者を、ラベル化した抗体分子が、血栓の一部に存在するhuTPhと反応し、複合体を作るのに十分な決められた時間、及び、好ましくは、未反応の抗体分子が体内から一掃されるのに十分な付加的時間違浮する。その後、被検者を、生成した複合体の存否及び好ましくはその位置について検定する。

2.身体サンプル中のカロTFhの検出

- トレた-

その後、残留暗組織固体を各々、その固体をヘブタン: ブタノール (2:1) 25ミリリットル (ms) 当り、組織関係18の割で、ヘブタン: ブタノール (2:1) と混合することによって行う5回の抽出を行ない、ついで建過により、その固体を回収する。最後の建過後、残智脳組織固体を再び大気圧下、約20で一晩で乾燥し、脱腎脳組織樹末を作り、必要になるまで、-80でに保存する。

つづいて、超組被約末25グラムをTS/BDTAバッファ (100ミリモル譲渡(mM) NaC2、50mMトリス・塩酸(せ7.5)、0.02 Mアン化ナトリウム、5mMエチレンジアミン四 酢酸(EDTA)、0.1 M (V/V) トリトンX-100(ポリアリルエチレン・9ーオクチルフェニルエーテル))500m2 と混合し、ついて4でで一晩原件する。さらにこの混合物を15、300×8で1時間速心する。生じたベレットを500m2 のバッファム(100mMNaC2、50mMトリス・塩酸(ph7.5)、0.02 Mアジ化ナトリウム、2 MトリトンX-100)に再想例し、スラリーを作る。 室温で1時間の視律後、このスラリーを上述のように遠心する。生じた上波を回収し、凍枯乾燥した後、100m2のパッファムに溶かして、カロTFト合有脳抽出溶液を作名

2. h u T F の 凝血活性を測定するための凝集検定法

huTFプロコアグラント活性を、31℃に維持した、全域限及び混合物を用いて行う、1段階級無検定法で測定した。血器と同容積の、20mMクエン設ナトリウム2水和物及び140mM NaC4 (pH7.4) を含む溶液を混合することにより、正常なヒト血珠をクエン設化した。TBS/BSA溶液(150mMNaC4、

平成 7.12.20 举行

具体サンプル、好きしくは体液サンプル中のトuTPAの存在、及び好をしくはその量を検出するため、競合的又は非競合的な、建トの不均一及び均一検定技が利用できる。別えば、液体体の液サンプルと、ラベル化したp26-49を、マイクロブレートのウェルの内型に固定した、ハイブリドーマTP8-5G9又はTF9-10H10から生更された抗体分子を含む固体サポートとに、固被相免疫反応流合物を作る。この混合物をサンプル中に存在するトuTFA及びラベル化したp26-49が、固体投充に存在するトで存在する抗体分子への結合を競争し、固体免疫反応を物を形成するのに十分な時間、生物学及反応を物から取り強く。未結合のラベル化p26-49を及反応を物として結合したラベル化p26-49の量を測定し、その差により、トuTPAの存在を検定できる。例

次に示す例は、本発明の以明を意図したもので、これを制限するものではない。

1.組織因子含有ヒト脳抽出物の調整

50mMトリス・HC & (pH 7.5)、0.1%子ウシ血清アルブミン)で容釈した h u TF を合むサンプル100マイクロリットルを、100 p & のクエン酸化血漿と混合した。25mMCaC & 源被100 p & を混合し、凝集反応混合物を作り、凝集が始まるまでゆっくりと描らした。CaC & 』 ※加と、凝血形成の間の時間を測定した。それから、h u TP 活性の環準曲級を、砂で示した凝集時間と容釈率をプロットすることにより作った。代表的環準曲級を第3回に示した。

3. ねれてFの親和性単態のための、因子が含有固体サポートの

とトの因子 YI / YI a を参考文献として組込まれている、フェア (Fair) の報告 (ブラッド (Blood)、62巻、784~91頁 (1983年)) に従って早難した。この単駆した因子 YI / YI a を、アガロース固体マトリックスに結合するため、4でで一晩、その5ミリグラム (ag) を、0.1 M2- (Nーモルホリノ) エクンスルホン酸 (MES) (pH6.5) に対して透析した。塩化カルシウムを最終速度1mMとなるように添加した。それから因子 YI / YI a を 4 m 2 のアファゲルー15 特性化アガロースピーズ (CA州、リッチモンド、バイオラド・ラボラトリーズ社) と混合し、生じた結合反応混合物を、製造業者が推薦するもの (バイナラド) に従って4 x、4 時間の回転処理を行った。

回体サポート上の過剰タンパク質結合部位を、その固体サポートを、0.1 Mグリシンエチルエステル中、盗温で 1 時間没伸することにより、ブロックした、その後、この固体サポートを、洗結ガラスロート上名的 2 0 e 8 の II) パッファ A、(2) 1 M Na C 2 含 有バッファ A、(3) 5 e M E D T A 含 オパッファ A 及び(4) 1 e M C a C 2 。含 有パッファ A をこの順序で用いて洗浄した。それか

ら遇刺の液体を波圧下で験き、半乾温状の粒子物質(ケーキ)を 作った。

4.huTFの因子ゼンVI=我和性による単離

0.1 Mのグリンンエチルエスチル及び 0.1 M MES(pH & 5)を含む 2.0 m & の容被を、 2.2 5 m 4 のアフィゲルー 1.5 アガロースピーズ (バイオラド) と現合し、結合反応混合物を作る。この結合反応混合物を重温に 1 時間維持する。この生成した結合物を、焼結ガラスロート上、 1.0 倍容のパッファ 1 を用い、減圧下で拡 過することにより快冷し、グリンンエチルエステルーアガロースケーキを作る。

例1で掲載した30mmをの協治出溶液を、1mm 塩化カルシウムを含む5リットルのパッファAに対し、4で、1 残透析を行う。透析した脳拍出物を、グリシンエチルエステルーナガロースケーキと混合し、固複相反応混合物を作る。回転しながら室弧で2時間維持した後、この固複相を焼結ガラスロートを用いて投送することで分離する。この液相を回収し、最終環度mm 当り10ユニットとなるようにトラシロール(MOH、セントルイス、シグマケミカル社、アプロチニン)と混合する。この回収した液相を例3で規製した因子リブリッノアガロースケーキと混合し、第2の固/液相混合物を作る。

この混合物を回転しながら、一晩もでに維持し、カロTP-因子相グ収 a 含有固相度物を形成させる。その後、この固相及び液相を光に述べたように維通により分離する。 焼結ガラスロート上に残留物する固相を 1 s M 塩化カルシウムを合むパッファ A 2 5 a A で洗やした。さらに、この固相を焼結ガラスクロマトグラフィーカラム (0.5 × 1 5 cm、パイオラド) に珍し、6 a A の同流 ラパッファで洗浄した。上記の洗浄後、この固体サポートに結合

huTFを、10分の1容のTF8-5G9又はPAb100 (ATCC-TIB115;ここでネガティブコントロールとし で用いられているSV40ラージT抗原特異的抗体を生産するハ イブリドーマ)ハイブリドーマ培養上滑とともに、4でで1晩イ ンキュベートすることにより免疫状況化を行った。アがロースピーズ(MO州、セントルイス、シグマ・ケミカル社)上に固定したヤギの抗でカス1gCを、その 第1次免疫反应度物を吸収するのに用いた。このビーズを同パッファでよく洗浄し、結合した *** I-huTFを、DTT存在下又は非存在下、同パッファ中で5分間煮沸することにより溶出した。SDS-PAGE後、タンパク質パンドはオートフルオログラフィーで可提化した。

単離したAuTFを放射性ヨウ素化し、DTTで運だし、ついで10 %アクリルアミドゲルでSDS-PAGE分析したとき、47kダルトンの見かけの分子量をもつ単一のメインパンドが現実された(第4図)。しかし、未運元のAuTFを同様に分析した場合は、およそ58及び47kDaの2つのパンドが相対的に称しい量で観察され(第5図レーンB)、このことは、少なくとも2つの異なる多きさのものの存在を示している。

非運元で観察されるこの2つのベンドに対する説明としては、 その大きな方、すなわち、決動が遅いベンドは、非常に多くのグ リコシル化を受けたものか、付加的なプロセッシングを受けてい ないタンパク質を有しているのか、又は、付加的な、ジスルフィ ド語合で結合したポリペプチドと会合しているのかもしれないと いうものである。選元後の単一バンドの存在は、はじめの2つの 示唆と一致している。その後者の可能性は中でも一番大きいよう に思えるが、その小さいサイズの差のために、付加的ポリペプチ ド頃は、色素の場所又はその付近に決動するような十分小さいも 平成 7.12.20 磁行

した h u T F を、焼結ガラスカラム上に保持されている国体サポートを 5 m M の P D T A を含むパッファ A で洗浄することにより、遊離 (浮出) させる。 溶出した物質を l m z 画分づつ回収し、各画分について、例 2 で述べた方法により、 h u T P の存否を検定した。 h u T P 含有質分を集め、 4 でで、 1 % ト 9 トン X ー 1 00 を含む 6 リットルの T B S (1 5 0 m M ト リス塩酸、 p H 7.5) に対して l 残透折した。

このようにして作った透析物をつづいて、4 信客の冷アセトンと混合し、huTPタンパク質を沈疑した。この沈殿をおよそー10 で、5000×8、30分間の遠心で無めた。生成したペレットを宣素雰囲気下で乾燥した。奥型的な収量は、駅間した脳組織粉末1ダラム(乾燥重量)当り、2 p8の huTPであった。

このようにして生じた単離トロTFサンプルをTBS/トリトン中に怒濁し、ついで、製造業者の指示に従がい(『し、ロックフェード、ピアス・ケミカル社)、ロードゲンを用い、Na ***!でラベル化した(『し州、アーリントンハイウ、アマーシャム社、マイクログラム当り』 5マイクロキューリ)。ラベル化後、過剰の未反応***『をTBS/トリトンを用いたセファデックスG25(NJ、ピスカタウィイ、ファルマシア社)での成塩クロマトグラフィーにより、ラベル化したトロTFから分離した。

**** I チベル化 h u T P 含有サンブルのラウリル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動による(S D S - P A G E)評価は、レムリ(Laenali)(ネイチャー(Nature)、2 2 7 巻、680~685頁(1970年))の方法に従った。選元条件下で評価するサンブルに対しては、100 mM のジチオスレイトールを、サンブルバッファ中に含有させた。154 h リトンX - 100、50 mM トリス塩酸(p H 7.4)、150 mM NaC & 中の****!

のらしく、選元後、10%アクリルアミドでは分離されないので あろう。15%のボリアクリルアミドゲルの運元及び非還元AuTP の電気泳動は、単一の分離した軽減を示すのには央敗したが、い くつかの少量の、速く泳動するパンドが観察された(第5図、レ ーンA及びB)。これらの小さい、少量のポリペプチドは、以前 に報告されているように (プローズ (Broze)) 等、ジャーナル・ オブ・パイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 、250 巻:10917~20頁(1985年)及びゲハ (Guba) 等、プ ロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエ ンス (Proc. Batl. Acad. Sci.) USA、83巻、299~302 頁(1986年))、汚染物を示している。この可能性を明らか にするため、4.7kDa 及び5.8kDa のパンドは非還元ゲルか ら切り出され、その各々を、ジチオスレイトールで運元し、その 各々を、15%アクリルアスドゲルを用いたSDS-PAGEに かけた (第5図、レーンC及びD)。 5 8kDタンパク質は125 kD軽額及び47kDa 重額であると分った。47kDa のタンパ ク賞を分析したとき、同分子量の重視のみが観察された。このよ うに、両者は、SDS-PAGEで同様の挙動をもつ重旗を保有 していた。

直接軽収の存在を示すため、***IートuTFを、huTF特 其的モノクローナル抗体TP8-5C3で免疫社取化し、それを 還元剤存在下の電気泳動にかけた。主要な47kDa パンドがお よそ、12.5kDa の分離したパンドとともに腹寒された(第6 図、レーンA)。 還元化しないサンプルの環気泳動でおよそ47 kDa 及び58kDa のパンドを生じたが、低い分子量のポリペプ チドは生じなかった(第6図、レーンB)。 また非運元huTP の電気泳動は、プローズ(Broze)等(ジャーナル・オブ・パイオ

平成 7.12.20

2 発行

ロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、260巻:10317 ~ 20頁(1985年))により示唆されているhuTP重観のダイマーと一致する、少量の90kDaタンパク質も示した。.

huTF軽額が重額からタンパク質の分解によって生ずるという可能性を研究するため、SDS-PAGEにより単離した軽額及び重額を、N末端アミノ酸配列分析にかけた。

■質及び軽額をSDS-PACEで分離し、アパーソールド (Abersold)等の高 pH 法 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Blot. Chea.)、261億、4225~4238 貝 (1986年))を用い、活性化した、アミノ被復ファイパーガラスフィルター上に電気プロットした。このタンパク質パンドを、蛍光染料(アパーソールド(Abersold)等、上記)により、このブロットを可視化し、切り出し、モレて、まだファイパーガラスに結合したまま、PT H誘導体のオン・ラインHPLC分析を、用いたアプライド・パイオシステムズ 470 Aタンパク質シークエンサーで配列決定した。別にタンパク質パンドをコマージ・ブルーによる染色によりゲルを可視化し、シークエンシングのために、軽気俗出した。同方法とも等しい結果を与えた。

トロTP重額のマイクロシークエンシングは、ほぼ等モル量のフミノ政区列で一致した結果となった。ほとんど全ての場合、各アミノ政務高は2サイクル離れて、2度出現する。これは、長さがN末端で2残器異なるトロTP重額の2つのパリアントがねじれたN末端をもつことの明白な証拠である。大きい方のパリアントのN末端は、非特定のアミノ致メを合む

Ser-Gly-X-X-Asn-Thr-Val-Ala-Ala-Tyr-X-Lee-fbr-Tep-Lys-aer であることが誘導された。

軽減の配列決定するいくつかの試みは、ブロックされたN未婚

タンパク質染色によって、会合した小ポリペプチド額を放出する でとは国観である。

イン・ビトロでは、単量体 h u T F が殺無を開始するにもかかわらず、 h u T F による 凝集の生理的開始は、細胞変面で起こる。 経験は、返接的凝集検定性で検出することができる。 h u T F 機能又は機構において重要な役割をはたしていることが推察できるであるう。例えば、軽額は、因子は/ V a の組織因子への結合の正の協同性を説明すると仮定されてまている。因子 V に対する 2 つのサブユニットレモプターのアッセンブリーに関与している可能性がある。別に、細胞表面上の構造ドメインでの h u T F を 機及び、細胞表面上での h u T F 活性の制御は、 h u T F 軽減に仲介されるのかもしれない。

N結合オリゴ糖の役割は、「・・」 - h u T F サンブルの数グルコシル化により試験した。低分およそ3.6×10° カウントを含む、ラベル化トu T F 約1274ナノグラムを0.4ユニットのグリコペプチダーゼ P (I N 州、インディアナポリス、ベーリンガー、マンハイム・バイオケミカルス社)、20m M トリス塩酸(p H 7.5)、10m M E D T A、及び134トリトンX-100を含む20μ g の溶液と混合し、37 でに16時間維持した。それから、この飲グリコシル化した座物を、先に述べた5DS-PAGEで分析した。

第1回、レーン 4 及び 5 に示した、脱グリコシル化の研究結果 は、5 8 k D a の h u TPは、別のタンパク質部分、すなわち軽 鏡の存在のため、4 7 k D a のものよりも、高い相対分子量を示 すことを表わしている。

・このようにして早難した h u T P を、 再脂質化し、そのプロコ アグラント活性が再構成された。 最高の活性を有する再脂質化組 と一致して、なんら配列の情報を与えなかった。しかし、BoTFの重貫及び軽痩は、単限されたトロTFに対して生じた、2つのウサギの抗トロTP抗血清及び28個の、マウスモノクローナル抗体の全でが、重氦のみに結合することが分っていることから、抗原的に全く別のものである。それゆえ、軽額は、重氦のタンパク質分解断片とは考えにくい。さらに軽値は、ベーター。ミクログロブリンに対する抗血清とは反応しなかった。

現在、125kDのhuTF軽額の意味は知られていない。それは、単一の、独立した分子額なので、ラングムなソスルフィド交換による、単層の際にアーティファクトとして誘導されたものでもないようだ。還元なしに、観和性による単離を行ったbuTFをSDSーPACEにかけたとき、huTF活性は、58kDsと47kDsの分子量に対応するがルから得出した。これら2つの分子量に対応するhuTF活性も、粗謀又は部分的に単類した胎盤の抽出物を、SDSゲルの電気決動にかけたとき(デーク示さず)も検出された。全ての場合において、その活性は、因子吸依存で、このことは、huTF特異的活性を示している。これらの知見は、huTFのみが因子でを活性化でき、かつ、軽額はこの機能に必要ないことを示している。

軽額がカuTF重額のおよそ半分のみにジスルフィド結合していることは興味深い。生体内で、カuTFの重要な領域に不在なのか、存在するのかとは別に、界面活性剤で分解される、非共有的相互作用を介して会合しているのであろう。軽額は、サイズが小さく、SDS-PAGEの際にマーカー色素の部分に体動してしまうため、また、カuTFの報告されている分析例が運元後行なわれていることから、初期の研究では気づかれなかった。現行の規和性を用いた方法で早離することができる問題された量では、

成因子庭物を提供するのに必要な組織因子:脂質比が、C.1 % B S A を含む H B S バッファ溶液(20 m M M N n C A 、0.01 % アジ化ナトリウム)中、種々の運度となるように、上述の得られた単離 h u T F を溶かすことにより実験的に測定された。それから、種々 h u T F 形 积 物 を以下に述べるように再腐 質化し、さらに、例 2 で報告されている 裏 無 検 定法で測定された、最も高い活性を示す比が、後の使用のために 物 固された。

トuTFの再贈實化のための賠質は、MO州、セントルイス、シグマケミカル社から入手できるウサギの賠アセトン抽出粉末から抽出することにより調製した。この粉末を、粉末18に対し、25m2のペプタン:ブタノール(2:1、v/v)の割でペプタン:ブタノールと混合し、ついでこれに含まれる固体を焼詰ガラスロートを用いた建造により回収した。残留固体をロト・エバポレーションで乾燥し、クロロホルムに溶解後、-80℃に保存した。必要なときに、そのクロロホルムに溶解した固体を資素雰囲気下で乾燥し、新しく調製した0.25%のデオキシコール設ナトリウム溶板中、4m2/m2となるように溶解し、ウザギ環リン脂質溶板(PBPL)を作った。

再陶賞化には、各huTF希釈物100μℓを、100μℓの RBPL溶液、0.76 mℓの1%ウン血清アルブミンを含む H BS溶液 (HBS/BSA) 及び40μℓの100 mM塩化カド・ ミウムと混合する。この混合物を2時間、37 Tに維持し、つい で、ここに含まれるhuTF活性を、例2で述べた凝素検定法で 測定した。

5. ハイブリドーマ及びモノグローナル抗体の作成

全てのハイブリドーマは、 6 ~ 8 週間の年令の、スクリプス・クリニック・アンド・リーサーチ・インスチチュート、動物飼育 場から入手できるメスのBaib/cマウス由来の解議細胞を用いて作成された。

a、マウスTF8の免疫化

例4で周製した製和性単離化 h u T F S マイクログラムを 100 μ g / u f となるよう生理 女塩水に溶かし、M O 州ハミルトンのリビ・イム/ケム・リサーチ社から入手した R − 7 0 0 アジュバントと 1:1の割合で混ぜ:エマルジョン化した。ついで、この・エマルジョンをマウス T F 8 に 皮下注射した。

このマウスTP8は同様に、約2週間線、変性huTF及びRナ100アジュパントを含むエマルジョンの接種を受けた。変性huTFは、0.09 %トリトンX-100、0.93 %SDS、0.2 M-2-3ルカプトエタノール及び270μg/mghuTHを含むTBS(150mM CaCgs、50mMトリスーHCg(pH7.5)を、5分間素練して調整した。その後、この変性したhuTFを、等容量の、0.6 mg/mg マウス血流アルブミンを含む生理食塩水と混合した。つづいて、4倍容のアセトンを、この変性huTF溶破に混ぜ、生じた混合物を、一號、-20でに保った。生じたは酸を約13000×g、10分間の遠心で無め、4:1 (マンマ)のアセトン:水で一度焼浄してから、0.1 mg/mg の場度となるよう、200μgの生理食塩水で懸濁した。

最初の注射から、約4週間後、0.1m4生理食塩水中33μ8: の親和性単離化 h u T F を、0.1m4の完全フロイント・アジュ パント (c F A) と混合し、エマルジョンを作り、これをマウス T F 8 に腹腔内注射をした。

最初の接種から8週間後、リン酸緩衝食塩水中15μgの観和

ム・パイオケミカルズ)をイムロン・96次フレキシブル・ビニルマイクロプレートのウェルに入れた。それからこのプレートを、1時間、37℃を維持し、1gGをウェルの壁に吸着させた。
TBSで3回洗浄した後、3パオパルミンを含む100glの
TBS/トリトンを各ウェルに入れい過剰のタンパク質結合部位
をプロックした。

ウェルを、1時間、約20℃に維持したのち、そのブロッキング溶液を、アスピレータで除いた。そして、各ウェルに50ggのハイブリドーマ培養上清を加えた。できた固治相免疫反応混合物を1時間、37℃に維持した。その後ウェルをTBSで3回洗浄し、過剰の核は、アスピレータで除いた。

例4で調製した、TBS/トリトン中、およそ10gのhuTFと、およそ5×10°cpmを含む、50μgのiiilラベル化huTFを各ウェルに入れ、第2の固被相免疫反応混合物を作った。そのウェルをTBS/トリトンで3回洗浄し、固相に結合した iiilーhuTF含有免疫反応置物を単雌した。過剰の液体はアスピレータで除き、ウェルを乾燥させた。個々のウェルを切り難し、各ウェルに含まれるiiilを、ガンマカウンクで針致した。

バックグランド放射活性 (ハロTFと抗体の反応無しの場合)はウェル当り、平均約200~300cpm であったが、一方、ハロTFと抗体の反応が有る場合は、ウェル当り10000cpm のカウントがある。抗ハロTF抗体の生産が正と検定されたハイブリドーマを選択し、本発明のハイブリドーマとした。つづいて、これらのハイブリドーマを、以下に述べるドット・ブロット検定でスクリーニングした。

b. ドット・ブロット・イライザ法

併して調製した、アセトン沈設したhuTFを、し:1 (ν/ν)

平成 7.12.20 磁行

性単離化トuTFを静脈注射(1. v.)し、同じトuTF/PBS接種を24時間後にも行った。そのマウスTF8の際和数を融合のため3日後に採取した。

b. マウスTF9の免疫化

マウスTP9は、2回のリビ・アジュバント注射に、エマルジョン化前に変性した h u TPを用いること以外は、マウスTF8と同じ接種スケジュールがほどこされた。さらに、第1回目の PBS接種の腹腔内注射をCFA含有接種接ょケ月半後に行なった。

c. ハイブリドーマの作成

TP8及びTF9由来の脚細胞に、同じ融合操作を行った。各マウス由来の抑細胞約1×10°個を、30%ポリエチレングルコール(PEG4000、ATCC25322ー68-3)を含む200μ4の融合媒体中、2×10°のP3X63A488.653.1ミエローマ細胞と混合した。細胞融合後、生じたハイブリドーマを96穴プレートに植植し、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジン)中で培養し、つづいて、huTPと反応する飲体分子生産館でスクリーニングした。

国マウスTF8及びTF9牌細胞由来の融合体共、HAT融合 媒体耐性ハイブリドーマ細胞クローンを生じた。TP8融合体は 907個のHAT耐性ハイブリドーマを、一方TF9融合体は、 348個のHAT耐性ハイブリドーマを生じた。

5. 抗huTF抗体分子の生産によるハイブリドーマのスクリー ニング

a. 固相RIA

TBS中、20με/mをに希収した100μεのヤギ坑マウス1mG(IN州、インデアナポリス、ペーリンガー・マンハイ

のアセトン:水溶液で抽出した。残存する状型をTBS中に20 P8/alとなるように整備した。このhuTP溶液20pg (1p4)を、構えないインクで、BA83ニトロセルロース紙 (シェレイチャー・アンド・シェエル、NH州、キーン)上に書いた数字の隣にスポットする。スポットしたhuTPを空気乾燥 し、個々のスポットをパンチを用いて、ディスクに切り出す。個々のディスクを、BLOTTO(ジョンソン(Johason)等、ジェネッティック・アナリティカル・テクニック(Geae, Asal, Toch.) 1巻、3頁(1984年))を含む、多次トレイの個々のウェルに使し、約1時間、37℃に被持した。

この日LOTTOを、ウェルからアスピレータで改き、各ウェルに、200g & のハイブリドーマ培養上清を加えた。さらにこのウェルを2時間、37℃に保ち、その後、このペーパーディスクを、TBSで2回洗浄し、ウェルから取り出し、TBSにより、さらに洗浄するため、1つの大きな容器に入れた。ついで、過剰の液体をその容器から除去する。

プロトブロット状類キットの(MI州、アン・アーバー、プロ メガバイオテク社)アルカリホスファターゼ結合抗マウス 1 e G を、BLOTTOで 5 7 0 0 倍に希収し、このペーパーディスク と佼験させた。このプロトブロット溶液との接触を、3 7 でで 3 0 分間保った。その後、ペーパーディスクを、TBS中で3 回 洗浄した。葉者の指示に従い、プロトブロットキット中に含まれ ている発色物質により、ディスク上に結合したアルカリホスファ クーゼが検出される。

c . ウェスタン・ブロット検定法

ウェスタン・プロット検定のため、例4で報告したように単離 した約10ggのhuTFをサンプルベッファ(2HSDS、

5 OaMジチオスレイトール、1 O Xグリセリン) に溶かし、5 . 分間、煮沸した。それから、これを、レムリ (Laounii)により報 告された (ネイチャー (Mature) 、226巻、680頁 (1970 年))、参考としてここに組込まれている、予め染色された分子 量複単の小さい両側のレーンの間の広いレーンに試料をロードす る、分取型のスラブゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲ ル世気泳動にかけた(分子量模準:MA州、ニュートンセンター、· ディパーシファアイド・パイオテク社)。 参考としてここに組込 まれている、トウピン(Towbia)等(プロシーディング・イン・ナ ショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Hatt. Acad. Sic.) USA. 7 6 巻、4.3 5 0 頁(1 8 7 9))により報告されて いるように、電気泳動及びニトロセルロースへの電気ブロッティ ング後、このプロットを、TBS中の5%脱脂粉乳溶液でプロッ クレ、マニホルドに固定した(M人州、ケンブリッジ、イムネチ クス社、モニブロッタ)。 8 個のハイブリドーマ和胞培養上演の ストックを、各マニホルドスロットにロードし、37℃で1時間 インキュペートした後、このブロットを取り除き、TBSで修浄 した(0.02%アジ化ナトリウム合有TBS)。抗体が結合した レーンを、発色物質で発色させたアルカリホスファターゼを結合 した第2抗体を用い、供給業者の推める方法に従って可谓化した (WI州、マジソン、プロメガパオテク、プロトブロット) 。陽 性のストック由来の培養上清を、5%脱脂粉乳TBSによる8倍 **希釈物について、別個に再テストし、抗TF抗伴を生産する個々** のハイブリドーマクローンの同定を行った。

抗トロTF抗体度生が正と判断されたハイブリドーマをさらに 特徴づけるために選択した。例えば、上記のTF 8 融合体由来の ハイブリドーマは、例 5 もで述べられている 5 ット・ブロット検

5 C 9 モノクローナル抗体 1 0 mgの透析により、活性化した。活性化したTP 8 - 5 G 9 を、 2 m 4 のアフィゲルー 1 O アガロースピーズ(パイオラド)と混合し、できたカップリング反応混合物を、製造業者の指示に従がい処理して、TP 8 - 5 C 9 / アガロース固体サポートを作った。

それから、例3で報告したように、固体サポート上の過剰のタンパク質結合部位をプロックし、洗浄後、減圧超過して、TFB -5G9/アガロースケーキを作った。

9. huTFの免疫競和性による単離

ヒトの脳のおよそ半分、すなわち約100maに等しい、例1で調製した脳油出溶液を、計64のパッファAに対し、2回の外液交換をしつつ、4でで3日間透析した。その透析した抽出物を1.5時間、10.000×sで違心した。できた上清を、例4で調製したグリシンエチルエステルーアガロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら、2時間窒温に維持したのち、その個相と液相を連結がラスロートによる護過で分割した。そのhuTP含有液相を回収し、例8で調製したTP8-509/アガロースケーキと混合し、同/液相免疫反応混合物を作った。

この免疫反応混合物を、回転しながら一晩、4℃に保ち、超機 因子含有固相免疫反応定物を形成させた。それから、この固相及 び液相を先に述べたように該過で分離した。固相が残留し、これ を10倍容のバッファムで洗浄した。その後、固相をガラスクロ マトグラフィーカラムに移し、頃次、(1)1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 倍容の1 M NaCa、及び四1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 6 2 2 6 2 0 0 0 0 0 1 M グリシン(pH 4 0)で続った。

上述の洗浄後、その団体サポートに免疫学的に結合している huTF、その固体サポートを、焼詰ガラスロート上に保持した 定法及び例 6 c で 述べられているウェスタンプロット検定法で h u T P との免疫反応を、そのハイブリドーマ培養上情が示すならば、抗hvTF抗体 連生ハイブリドーマ培養上情が示すならば、抗hvTF抗体 連生ハイブリドーマ培養と特徴づけられる。これらの特徴は、2 4 個のT P 9 ハイブリドーマ 出物 流列について ろられ、そのほとんどは、例 1 3 の第 5 妻に示した。その値のスクリーニング法で選択したハイブリドーマにより度生される抗体分子はII 解剖 記を独自の融合体に提供する免疫化マウス (すなわちT P 8 又はT F 9)、及び、独特の H A T 培 社 財性ハイブリドーマ 相 物が 単端 される、9 6 介 培養プレート、列番号及びウェル番号を示す文字によって呼ばれる(すなわち、5 8 7、1 1 D 1 2、その他)。特殊な意味の文字は、1 節、ハイフン 暦 又は 2 ほとして、ここにリストされる。例えば次の文字は同じモノクローナル抗体分子組成を意味している;T P 8 - 5 G 9 及び T P 8 - 5 G 9 な T P 8 - 5 G 9 な T P 8 - 5 G 9 な T P 8 - 5 G 9 な T P 8 - 5 G 9 な T P 8 - 5 G 9 な T P 8 - 5 G 9 な T P 8 - 5 G 9 な T P 8 - 5 G 9 な T P 8 - 5 G 9 な T P 8 - 5 G 9 な T P 8 -

7. イムノグロブリン laCの単離

イムノグロブリン』 EGは、製造業者の指示に従がい、パイオラドラボラトリーズMAPS Eシステムを用い、マウスのハイブリドーマ和助系列TP8-5G9 (ATCC事HB9388号)を含むマウスの腹水液から単離される。単離した』 EGのタンパク受滅度は、製造業者の説明書に従がい、BCAタンパク質検定は類(ピアスケミカル社)を用いて別定した。

8. huTPの免疫調和性による単類のための、抗ねuTP含有 関体サポートの調質

抗トuTP抗体を、アガロース固体マトリックスへカップリングするため、少なくとも1回診析液交換を行う、0.1 M MES、pH6.5 を含む500mLの透析パッファに対する、4 C、 l 6 時間の、例7で報告したように掲製した、MAPS早難TP8-

まま、7.1 Mグリシン、 pH 2.5 及び1 M トリトンX - 1 0 0 溶液 2 0 m A で洗浄することにより、関放 (溶出) した。それから、例 4 に全て述べたように、溶出物質を回収し、 h u T F 検定を行ない、気めて透析した。

这折物を 4 倍容の冷了セトンと混合し、 h u T P タンパク質を 沈殿化した。さらにこの沈殿をおよそ - 1 0 で、5.000×5、 3 0 分の遠心で築めた。生成したペレットを質素雰囲気下で乾燥 し、そのペレットの一部を変性条件でのSDS-ポリアクリルア ミドゲル電気氷動で分析した(SDS-PAGE)。

第8図に示したこの分析結果は、huTFが免疫費和性により、 脱脂語切末1グラム当り、33mgのhuTFの収率で単離される ことを示している。

10. 抗トロTF抗体による凝集の阻害

10月10ハイブリドーマ培養上清を、例4で調製した約2mgの再脂質化トロTFを含む90月10円BS/BS人と混合した。このようにして作った免疫反応混合物を30分間37でに保ち、流トロTF抗体分子を免疫学的にトロTFに結合させ、免疫反応 震物を形成させた。つづいて、この免疫反応混合物について、例2で述べたように、トロTFのプロコアグラント活性を検定した。 オガティブ・コントロールとして、無関係の1gC調製物を抗トロTF抗体の代りに用いた。

幼果的 A u T F 浸度は、インヒビクーの存在下測定した凝血時間を用い、例 2 のように作った標準曲線から外持した。阻害は、用いた実際の A u T F 浸度について、効果的 A u T F 浸度の比率として表わされる。少なくとも50パーセントの阻害をするモノクローナル原件分子概要物は、本発明の原体分子成分を中和するものとして退収された。

例 6 に述べたように、単離した h u T F に対して生じたハイブ リドーマ由来の数あい培養上清を、積集開始を阻害する能力につ いて、先の操作により測定した。有意に凝集を阻害することが分 ったハイブリドーマを、第 5 表に示した。

また、抗トuTF抗体による凝集阻害は、予め形成されたhuTF-BTでは合体を用いて行った。例4で調製した再設質化したトuTF1nsを含む10μ2を、HBS/BSA70μ2、20mM塩化カルシウム10μ2を次例3で述べられているように調製した因子約25nsを含む10μ2と混合する。この混合物を15分間37でに優ち、トuTFを、混合物として使える因子がとは複合体をつくらせる。その後、10μ2の溶液に、例7ではべたように調製したMAPS-単離化モノクローナル抗体的10msを混合し、この第2の混合物を、30分間37でに保った。さらに、第1に20mM塩化カルシウム100μ2ついで、ヒトのクエン酸化血強又は例12で述べてように調製した因子は、1に20mM塩化カルシウム100μ2ついで、ヒトのクエン酸化血強又は例12で述べてように調製したのの数単限等の測定を行った。例10で述べられているように、阻害率を変わし、予め形成したトuTF-因子母複合体での阻害の結果を、第5m表に示した。

第 6 表

抗 h u T P による h u T F - 因子 VL 依存の最集阻害 1. クエン酸化ヒト血器による凝集

抗 体		. 阻害率
プランク*	+	. 0
TT856	g , +	5 8 %
コントロー	n +	. 0
TRRSG	a <u>-</u>	8 3.%

複合体により開始する破無を阻害する能力を有意にもつと考えた。 これらのM o A b には、T F 9 - 1 B 8、T F 9 - 5 B 7、T P 8 - 5 C 4、T F 8 - 1 1 D 1 2、及びT P 8 - 2 1 F 2 がある。 1 1、ポリペプチド合成

ここで使用されている種々の h u T P h 領域に対応するボリベプチドモハゲンメイヤー(Ragensaier) 等(ポップーセイラーズ (Hoppa-Sayler's) 2. フィジオロジカル・ケミストリー、353 港、1973頁(1982年)) のシンメトリカル・アンハイドライド法を用いたアプライド・バイオシステムズモデル430人ペプチド合成級で化学合成した。第1及び第2表のポリペプチドに加え、以下に示す第3表のポリペプチドも合成し、これには、h u T F h と反応できる抗ポリペプチド抗体の生産に有用な、本発明のポリペプチドが含まれている。

第 3 表

・ 抗原性ポリペプチド

p121-155 H-TKVHVTVIDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTL-OH p204-216 H-DSPVECHGGEKGEFREIFVIGA-OH p225-244 H-GRAVVFVUILVILLAISLHK-OH p245-261 H-GRKAGVGGSWKENSPLNVS-OH

12. ポリペプチドによる凝集阻害

AuTP依存の職業開始を疎開する、本発明のポリペプチャの 能力を、まず、このポリペプチドを因子リノリコ及びカルシウム イオン存在下でインキュペーションし、さらにこの混合物を、因 子リノリコ欠損血張に加えて、凝血時間を見積った。

E F の因子切 / VI a を例 3 に述べた方法で早期した。H B S / B S A a a B り、この単類した因子VI / VI 2 0 0 n g の溶液 1 0 y a に、 i 0 0 p a H B S、 2 0 p a 2 5 mM CaC i 。及び100 11. 因子なテプリート化ヒト血器

コントロール

抗体	因子可	阻害率
ブランク	+	, 0
T P 8 5 G 9	. +	5 8 %
コントロール	+	0

- a. ・ブランク・とは、モノクローナル抗体を検定法で用いなかったことを示している。
- b. 『TP85G9』とは、ハイブリドーマTF8-569から 単贈したモノクローナル抗体を検定で用いたことを示している。
- c. "コントロール"とは、検定で無関係なモノクローナル抗体 **

 本田いたことを示している。
- d. ・・・は、抗体を混合物に加える前、因子可を加え、複製したhuTPと複合体を形成させることを示す。

抗huTF抗体による凝集国客の別の研究が、TFを因子をノ 関っと会合させ、TP:因子VI/Wa複合体を形成させる前後の 関本を比較する条件下で行った。

これらの研究で、予め形成したTP:W/Wa複合体を用いた 飲れuTPh抗体による最集領客を、利用するモノクローナル抗 体合有溶液10μgにMAPS早離化モノクローナル抗体合有溶 液の代りに、ハイブリドーマ培養上清を用いた以外、例10で述 べたのと基本的に同様に行った。比較のため、抗トuTP抗体に よる軽無阻害を、例10で述べたように、因子W/Waを合むク エン酸化血媒との遺合の前、それら抗体及び再路質化トuTFの 他は複合体を形成することにより検定した。

ここで述べている全ての抗体は、この比較阻害検定は験を行ったが、約60分以上の服害を示すものだけが、huTP: W/Wa・

p & の合成ポリペプチド含有TBS/トリトンを加えた。種々の 護度で含まれる多種の混合物をこのように調製し、それを、15 分間、37七に競技した。例もで述べたように領型した再覧質化 した組織因子を、HBS/8SAで希収し、例2で述べたような 森集検定法でテストしたとき、10g』でおよそ45秒の凝集時 間が得られるように観製した。上記のように維持した混合物をさ らに、再胎質化huTF10# 8 若収物、25 mM C a C a a 1 0 0 μA及び1容の血器に対し1.5容のHBSで希釈した因子は/VIA 欠損血器 1 0 0 μ g (K A州、オーパーランド・パーク、ジョー ジ・キング・パイオメティカル社)と混合した。森血時間の延長 は、この合成ポリペプチドによる凝集の阻害を示していることに なる。阻害率を、例10で述べているように計算した。少なくと も30%の破集阻害を示すポリペプチドはhuTFh結合師位状 リペプチド類似物、すなわち;第4妻のセクション!で示されて いるポリペプチド、p26-49、p146-107及び9161 -189である。

別に、上記阻害検定において、モノクローナル抗体による免疫 我和性吸著により、因子VI/VI = 欠損血機である因子VI/VI = 欠 損血機を用いた。ヒトの因子VI/VI = た対するモノクローナル抗 体を、例3で述べたように単離した因子VI/VI = を h u T F の代 うに免疫原として用いた以外、例5で述べたものと基本的に同様 に調製した。できたハイブリドーマを、イライザ法で評価し、 1 N州、サウスペンド、エンザイム・リサーチ・ラボラトリーズ 社から入手できるヒトの血液タンパク質、タンパク質S、因子II、 因子X及び因子 B と反応しないハイブリドーマを同定した。その ようなハイブリドーマ、F V 1 1、F 1、2 H 3 - 3.2 は、T.S. エジントン(Edgington) 博士から載いた(C A州、ラジョラ・ スクリプス・クリニック・アンド・リサーチ・ファンデーション社)。イムノグロブリンIgGを、ハイブリドーマFVII、FI、2H3-3.2を含むマウスの腹水から単凝し、この単離したIgGを、例8に述べたように、固体サポートに結合させた。できた抗因子MI/MIaモノクローナル抗体含有固体サポートを貯留した正常なクエン酸化血量から、血漿含有液相を収積し、保留すること以外、例9で述べた免疫親和性操作を用いて、因子MI/MIaを除くのに用いた。

脂質化型で用いたとき、競合的に凝集を阻害する、いくつかのポリペプチドの能力を、100μLの合成ポリペプチド溶版の代 りに、100μLの脂質化合成ポリペプチドを用いることにより 上記検定法での評価を行った。

即實化合成ペプチドは、合成ポリペプチドを、単難したhatfの代的に用いること以外は、早難したhuTFの再覧質化で用いた。例もで述べた方法で課題した。ルーチンには難覚とポリペプチドの比は52:1(マグマ)が用いられた。少なくとも30%の設集阻害を起こす難賞化ポリペプチドが、難質化型で存在するとき、huTF結合部位ポリペプチド担似物すなわち、第4表のセクションITで示されたポリペプチドと考えた。

第 4 表

huTFhのボリペプチド類似物の huTFによる凝集開始の阻害

ペプチド	選 審	•
1. 非リン脂質化ペプチ	F	過度
p 1 - 3 0	2 5. 0	10 u M
p 2 6 - 4 9	8 8. 8 .	10 u M
p 4 1 = 7 1 ·	2 5. 0	10 u M

t.

50μεのハイブリドーマ培養上滑を各ウェルに入れ、1時間 37年に維持した。さらにこのウェルをTBSで3回洗申し、過 刺の液体をアスピレータで除いた。

単離化huTPは、例 9 で述べたように、免疫規和性カラムで 切裂した。単離化huTPを含むアセトン比較をTBS/トリト ンに溶かし、そのタンパク質濃度を、製造業者の説明書に従がい、 BCAタンパク質検定は取(ピアス)を用いて測定した。huTF の炭化水素側値を、オシャネシー(O'shannessy) 等の報告した 方法(イムノロジカル・レターズ(lannuol. Leiters)。8 巻、 2 7 3 ~ 2 2 7 頁(1 9 8 4 年))に従がい、ビオチンーヒドラ ジド(NY州、ブレインビュー、1 CNパイオメディカル社)を 用いて、ビオチン化し、ビオチン化huTP溶液を作った。

TBS/トリトン中60ng/maに誤製した50μaのヒオチン化huTP溶液を、5μM合成ポリペプチドとともに、各ウェルに入れ、1時間、37℃に軽持した。その後、このウェルをTBS/トリトンで3回洗浄した。

5 mM BDTA、0.5 %トリトンX-100及び1%BSA を含むTBSで1/100に希釈した、100μ4のストレプトアビジンー結合アルカリホスファターゼ (NY州、ニューヨーク、エンゾバイオケム社、デテク!ーsik)を含ウェルに入れ、30分間、37 にに維持した。その後、このウェルを、10mMリン設カリウム (pB6.5)、2%BSA、0.5%トリトンX-100、0.5 M塩化ナトリウム及び1mM EDTAを含む溶液を4回洗い、ついで検出バッファ (0.1 Mトリス・塩酸 (pB8.8)、0.1 M RaC4、5 mM MaC4。)で1度洗った。

その後、検出パッファ中、2mMのp-ニトロフェニルリン酸

									平成	7.	12.	2	()		発	行
	P	4	0	-	4	9			2 5. 0		1	0	u	М			-
	p	5	6	-	7	1			25.0		1	0	u	M			
	P	7	2	_	1	0	4		2 5. 0		· 1	0	u	М			•
	P	9	. 4	-	1	2	3		2 6. 0		i	0	u	М			
	p	1	2	1	_	I	5	5	10.0		1	0	u	M	•		
	P	ı	4	6	_	ı	6	7	8 7. 5		1	8	น	M			_
	P	1	5	ļ	-	1	8	9	3 2 5		· 1	0	u	M			•
	P	1	9	0	-	2	0	9	2 0. 0		1	0	u	M			
٠	P	2	0	4		2	2	6	2 0. 0		1	0	u	M			
			1%		L				0								
1.	ŋ	ン	H	貫	/Ł	~	ブ	チ	F								
	P	ı	-	3	0				8 1. 0		1	0	u	M			
	P	2	6	÷	4	0			8 3. 0		1	0	u	M		•	
	P	4	0	-	7	i			6 5. 0		1	0	· u	M			
	P	5	0	-	7	i			7 3. 3		3	0	u	M			
	P	9	4	-	1	2	3	•	9 3. 7		1	0	u	M			
	P	1	2	1	_	1	5	5	5 5. 0		- 1	0	u	M			:
	P	i	4	6	-	1	6	7	8 0. 0		. 1	0	u	M			
	P	1	6	1	-	1	8	9	9 4. 0		1	0	u	M			

2. 別12で述べたように測定した阻害率

上記のポリペプチド国客研究で得られた代表的投与一応答曲線 を第9及び第10回に示した。

13. ポリペプチドによる抗体-huTF免疫反応の阻害

フレキシブルビニルでできたイムロンU使96次プレート(ダィナテク社)のウェルを過剰タンパク質結合部位のブロッキングを、37℃20分間行うこと以外、例6で述べた方法でヤギ抗マウス1mG(ペーリンガーマンハイム社)によりコーティングし

を含む溶液 100 μ g を各ウェルに加え、1 時間 3 7 でに 検持する。ついで、 4 0 5 ナノメーターでの光学密度を各ウェルについて、 パイオ・テク・マイクロプレートリーダー (V T 州、 ウィノースキ、 バイオ・テク・インスツルメント)を用いて測定した。この競合的阻害研究の結果を第5 責に示した。

第 5 衰

モノクローナル抗体とペプチドの相互作用の表

					-								
	Mad*	9 i 20 - 30	p26 -49	940 -71	р41 -49	₽56 -71	P72 -104	₽94 -123	p121 -155	p146 -167	p161 -189	₽190 •209	
	TF85G9		+										
	TF811D1	2	•										
	TF85C4							+	٠		•		•
	TF821F2					•							
	TF91D5					+		+		+			
	1F92C4			•		+		+			•		
	TF92F6						•			-	+		
	TF 95 C7			4		+	•	•		+	٠.		
	TF96B4					•				. +			
	TP99C3			٠,		+				+			
	_TF910C2		••			+				ŧ			
	TP91F1	_	+		_								
	1F91E7				·		+		•	•		•	
	179188			+						•	+		•
	7F91B9		* .	٠.									
	TF94D11		. +	4		٠,							
	179564		٠.			+							
	1F95B7 .			· ·									
	1F96G4				٠			•					
_	3 P .												

TF910810* +

- a. 各モノクローナル抗体 (Hob)は、同名のハイブリドーマにより産生された。全てのハイブリドーマは例13で述べたように、ハイブリドーマ培養物上演を用いてスクリーニングした。
- b. これらの抗体は、例10の結果から中和性をもたないと考えた;その他の全ての抗体は、同結果に従がい中和性をもつと考えた。

もし、ポリペプチド存在下で得られた吸光度測定値が、ポリペ プチド非存在下で与えられた抗体に対して得られた平均値値から 1以上の領準偏差をもつとき、即客が有意に起ったと考えた。

14.2節位イライザ法による身体サンブルにおける b u T F 校 出

車波、血漿、嗅液、尿、その他の身体サンプル中のhuTFは、同じhuTF分子に同時に結合することができる2つのモノクローナル抗体を用いて検出できる。

イムロン・ポリスチレンU底96穴プレートを、まず、含ウェルに、TBS中10gg/mをに需収した1gC·100μを入れ、ついで、ウェルと、1gG溶液との浸触を、4で、一晩健持することにより、ヤギ抗マウス1gG(ペーリンガーマンハイム社)でコートした。そのウェルを、TBSで3回洗浄し、ついで、

が A u T P に同時に結合できる能力をもつ限り、いろいろ変えることができる。例えば、第1 抗体として、T P 9 - 6 B 4 を用いたとき、T P 9 - 1 1 D 1 2 を、T P 9 - 1 0 H 1 0 の代りに、第2 の抗体として用いることができる。このように、本発明は、本技定法で同時に結合できる種々の抗体の組合せを考案した。15.全プレ h u T P h コード配列を含む D N A 断片の情染

全プレトロTFコード配列を含むDNA断片を第11回にその制限地図に示されている、組換えプラスミドリCTF64、pCTP403及びpCTF314と、この分野でよく知られている操作を用いて構築することができる。例えば、マニアチス(Hanistis)等、NY州、コールドスプリングハーパー、モレキュラー・ラボラトリー、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニング(1983年)参照。

第11図で示されている組換えDNAプラスミド中に含まれる 挿入断片は、クローニングを可能にする、各末端のEcoR(リソカー5、一CGAATTCCー3、(MA州、レキシントン、コラボラチ ブリサーチ社)を有している。これらのリンカー配列は、天然の h u TPh DNAコード配列の一部ではないので、第2図に示されるヌクレオチド配列中には存在しない。組換えDNA分子提 婆の説明は、周様するhuTFh DNA配列についても明らかなように、BcoR1末端を含む消化により生じ、これらの付加的なリンカー配列を含む断片は、第2図で示したヌクレオチド塩差 香号によって示されるだろう。この断片は、その末端にこれら付 加的配列を含むことが理解できよう。

プラスミド p C T F 6 4 を、制限エンドスクレアーゼ E coR I 及び D ra II で消化し、第2 図で示される、塩香残器 1 ~ 2 9 6 番 に対応するヌクレオチド配列を含む D N A 断片を作った。このよ キウェルに、3 % B S A を含む T B S / トリトン 1 0 0 μ 4 を加 えた。その後、これらのウェルを1時間、3 7 でに維持してから、 T B S で 3 回決浄し、さらに、遇到の液体をアスピレータで除い た。

第1のハイブリドーマ、TF3-6B4由来の抗トッTP抗体 分子含有培養上渡100m 4 を含うェルに入れ、1時間37℃に 雑辞した。それから、これらのウェルをTBSで3回洗浄し、つ いで過剰の液体を、アスピレータで除いた。

例3で閲製したように、免疫観和性単離し、アセトン比較化 huTFを、TBS/トリトンに溶した。このhuTF溶液の特 表物をTBS/トリトンで5μg/mgからな5ng/mgの範囲 で調製し、希釈液100μgをイムロンプレートのウェルに入れ た。このhuTF希釈液を、第1の抗体と接触させ、1時間37 たに建神した。さらにこの希釈物をウェルから除き、ウェルを TBS/トリトンで3回洗浄した。通剰の液体をアスピレータで 除いた。

抗トロTF抗体を、例でで述べた方法により、第2のハイブリドーマ丁F9-10H10の酸水からMAPSで早離した。この抗体溶板のタンパク質を例定し、ついて、例13で述べたようにピオチン化によりラベル化した。

このビオチン化した抗トロTF抗体をTBS/トリトンで50 ng/zgに希釈し、この溶液100μgを等ウェルに入れた。 そのウェルを1時間、37℃に維持し、ついでTBS/トリトンで3回流った。

この結合した、ビオテン化抗 h u T P 抗体を、例 1 3 で述べた デテク I -alk システムを用いて検出した。この検定法で第 1 及 び第 2 の抗体として用いているモノクローナル抗体は、その 8 つ

うにして作った、302ヌクレオチド塩基対 (bp) 断片をアガロ ースゲルを用いたサイズ分面により具際し、アルカリホスファタ ーゼを用いた処理により脱りン酸化した。

プラスミドPCTP403を制限エンドスクレアーゼEcoRlで消化し、第2図の残器718~1125番に対応するメクレオチド亞列を含むDNA断片を作った。生成した352bpの断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分画により単駆した。

プラスミドp CTP314を、制限エンドスクレアーゼEcoRIで消化し、生成した647bpの断片をサイズ分画で単離した。この断片は、第2図の残器135~775番の配列に対応するスクレオチド配列を含んでいる。647bp断片をサイズ分画で早離し、アルカリホスファターゼで限りン酸化した。

この352bp断片及び脱りン酸化した647bp断片をT4DMAリガーゼの反応によって機能的に結合(ライゲーション)し、第2図の残酷135~1125番に対応するスクレオチド配列を有する999bpの断片を作った。

さらに、この999bp断片を、割限エンドスクレアーゼ Dra TT で捕化し、第2図の残益296と297者の間でこの999bb断片を切断し、これによって、168bpと831bpの断片が生ずる。 さらに 放り ン 飲化した302bpの断片と、831bpの断片を T4DNAリガーゼで機能的に結合し、第2図の1~1125番に対応するスクレオチド配列を含む1125bp断片を作った。

EcoRIで消化して、クローニングプラスをドベクター p U C 8 を線状にした。先に調製した 1 1 3 3 bp断片と、EcoRI消化 したベクターをT 4 D N A リガーゼで機能的に結合して環状組換 えD N A 分子 p U C - プレト u T P h を作った。

大調菌RR1株(MD州、ゲイサーズパーグ、ベセスグ・リサ

平成 7. 12. 20

ーチラポラトリーズ) をpUC-プレトuTFトでトランスホー ふし、そしてアンピジリン団性に基づいて、トランスホーマント を選択した。それから、この選択したトランスホーマントをクロ ーン化し、プレトロTPト構造遺伝子をもつ組換えDNA分子の 存在によりスクリーニングした。

プレトルTFト接換遺伝子をもつ組換えDNA分子の存在によ るスクリーニングは、各選択されたトランスホーマント由来の r DNAをBcoRlで消化することによって行った。生じた EcoRI断片をアガロースゲルでサイズに従って分解した。352 bp、181bp及び2682bpのDNA断片に対応する三つのペン ドパターンを示す組換えDNA分子でプレカuTPA構造遺伝子 の存在を確めた。上述のBcoRI消化パターンを生ずるrDNA を有する大陽関RRIトランスホーマントは、本発明の組換え DNA分子を含み、かつ、選択され(回収)された。

細胞外アンカー領域を含むが、カルボキシル末端にトランスメ ンプレン・アンカー領域を欠く、プレトロTFトコード配列の実 質的領域を含み、従って、可溶性huTPhタンパク質をコード するDNA断片を次のように構築した。

プラスミドロCTP64を制限エンドスクレアーゼBcoRlで 消化し、第2回の1~486番の残基に対応するヌクレオチド型 剤を含むDNA断片を作った。このようにしてきた 4 8 6 boの断 片を、アガロースゲルを用いたサイズ分面で単鱗し、その後、ア ルカリホスファクーゼ処理で説りン酸化した。つぎに、このよう に脱りン酸化した4.8.5 bpの断片を制限エンドヌクレアーゼDra □を用いて消化し、第2回の296巻と197番の間の郵位で、 4 8 6 bp断片を切断し、2 9 6 bp及び 1 9 0 bpの断片とした。こ の296bpの跛片をアガロースゲルのサイズ分画で単離した。

(1983年))の方法に従がい、互いにオリゴヌクレオチドが 機能的に結合するのを防ぐため、ポリヌクレオチドキナーゼによ りリン酸化を行なわれなかったこと以外は同様にして、

5 ' - AATTTAGAGAATAAGAATTCGGG - 3 ' AU

3 ' - ATCTCTTATTCTTAAGCCC- 5

の記列をもつ、合成オリゴヌクレオチドフダブター断片を作った。 このオリゴヌクレオチドをアニールし、粘着EcoRI未満を含む 二本銭DN人リンカー断片を作り、ローザースタイン(Rotherstein)の方法(メソッズ・イン・エンザイモロジー(Hotheds in Enzymol.)、6 B 巻、9 8 頁(1 9 7 9 年))に従って、平滑末 雄とした。つぎに、このリンカー断片を、gUC-ブレhu7Fh ーTから得た115bp断片に機能的に結合し、175bp断片の各 末端に1つのアニール断片を含む817bp断片を作った。その後、 この817bp断片をEcoRlで消化し、817bp断片の各末鏡 も平滑からBcoR 1 粘着末端へと転換し、8 0 5 bp断片とした。 この805bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で単離し

クローニングプラスミドベクターpUClBをEcoRlで消化 し縁状化した。先に調製した805bp断片とBcoR I 消化したべ クターをT4DNAリガーゼを用いて機能的に結合し、環状組換 えDNA分子ャリC-プレカロTPh-TRとした。

大鍋歯RRIをpUCープレトaTFh-TRでトランスホー ムし、pUC-ブレトuTFh-TRを含むクローンである、ア ンピシリン耐性トランスホーマントを選択した。

. 16.組換え入山TFhコード配列の発現に反入山TFhの生産 組換えDNA分子由来の観換えれいTFhの発現は原核性細菌 細胞、非労推算核性細胞及びより高等な(脊椎)異核性細胞を含

プラスミドゥCTF314を削減エンドヌクレアーゼEcoRI で消化し、第2回の135~715番の残器に対応するヌクレオ チド配列を含むDNA断片を作った。この641bp断片をアガロ ースゲルを用いたサイズ分面で単離し、ついで、アルカリホスフ ァクーゼ処理により設りン酸化した。この取りン酸化した641 bp断片を、 D га ш で 排化し、第2図の 29 6 番及び 29 7 等の 断 の部位で、この641bp断片を切断し、これにより、162bp及 び 4 7 9 bpの断片とした。このうち、4 7 9 bp断片をアガロース ゲルを用いたサイズ分頭により意覧した。

上述のように調製した29 6 bp及び479 bpの筋片を、T.4 DNAリガーゼを用いた反応により級能的に結合(ライゲーショ ン)し、第2図の1番から775番の配列に対応するダクレオチ ドコダプター配列を布する7月5bp断片を作った。

クローニングプラスミドベクターp U C 1 8をEcoR 1 による 消化で級状化する。上紀のように顕製した175bp 断片と、 BcoRl消化ベクターをTIDNAリガーゼで機能的に結合し、 環状組換えDNK分子p UC-プレトロTFh-Tを作った。

大陽密RRIを、pUC-プレトロTFh-Tでトランスホー ムし、p U C - プレカロTFh-Tを合むクローンであるアンピ シリン耐性トランスホーマントを選択した。

超換えDNA分子pUC-プレhuTFh-TをBcoRIで摘 · 化し、生成した775bp 断片をサイズ分画で単離した。.

カルーザース(Caruthera) 等(ジャーナル・オブ・アメリカ ン・ケミカル・ソサイアティー(J. Am. Chem. Soc.) 、 1 0 3 巻、3185頁(1981年))及びゲイト(Gait)等(コール ド・スプリング・ハーバー・シンポジウム・クオント・パイオロ ジー(Cold. Spring Harbor Syap, Quant. Biol.) 4 7 巻、393

む穏々の発現媒体中で行うことができる。そのような発現媒体の 代表例には、各々、大馬南S、セレビシアエ(cerevisiae)及び チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 祖胞がある。

a. 大騎面におけるプレカロTFカの発現

大腸図において、プレトロTFF構造遺伝子を発現できる超換 えDNA分子は、例15で作ったpUC-プレカロTFト組換え DNA分子由来のプレトuTPト遺伝子合有DNA断片を単別し、 ついで、この断片を原核性発現ベクターに複能的に結合すること により構築することができる。

組換えDNA分子pUC-プレカuTPhを、そのプラスミド 中に存在するBcoR」部位を部分的に切断するような条件で、 BcoR F消化する。この部分消化法は、アニアチス(Maniatls) 等、NY州、コールドスプリング・ハーパー、コールドスプリン グハーパー・ラボラトリーズ、ラボラトリーマニュアル、モレキ ュラー・クローニングにより詳細に報告されている。図2の残器 しまから、1125番で示される配列に対応するヌクレオチド配 列を含む1133bp断片を、サイズ分面によりBcoR「部分分解 産物から単雄した。

原核性発現ベクター p K K 2 2 3 - 3 (N J 州、ピスカタウェ イ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社)を、EcoR·I によ る消化で線状化した。この消化ベクター及び1133bp プレ huTFh構造遺伝子合有断片をT4DNAリガーゼを用いて磔 能的に結合し、環状組換えDNA分子タKK-ブレカロTFhを 作った。

大脳間RR1をpKK-プレトロTPAでトランスホームし、 pKKープレカロTFh含有クローンとしてアンピシリン耐性ト ランスホーマントを選択した。

平成 7.12.20 *

b. 大猫間におけるhuTFhの発現

大場面において h u T P 遺伝子を発現することができる疑点え D N A 分子は、例 1 6 a で調製した 1 1 3 3 b p 断片を操作しては 扱した。 まずこの断片をアルカリホスファターゼで放りン酸化し、 ついで、制限エンドヌクレアーゼ B b v J で補化した。生じた964 b p の断片は、第 2 図の残器 1 6 4 ~ 1 1 2 5 番に対応するヌクレ オチド配列を含んでおり、サイズ分面により単離した。

先に述べたように、

5'-AATTGACATGTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATT-3',

及び

3'-CTGTACAGTCCGTGATGTTTATGACACCGTCGTATATTAAATTG-5',
の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作り、ロサースチイン(Rotheratein)等(メソッズ・イン・エンザイモロジー(Hethods in Enzymol.)68巻、98頁(1979年))
の方法に従って、枯着BcoR L 及びBbvl 末端を合む二本額・DNAリンカー断片をアニーリングすることにより作った。このリンカーをまず964bp 断片に凝惚的に結合して、1008bp 断とした。ついで、1008bp 断片を、T4DNAリガーゼを用い、EcoR I 博化したベクターpKK223-3と機能的に結合し、環状組換えDNA分子pKK-huTFhを作った。

超換えDNA分子 pKK-huTPhは、pKK-プレ heTFhと、(1)残落1~128番の残器がない、及び切断しいメチオニンコドンが、残器130番の耐に機能的に結合しており、その結果タンパク質発現(翻訳)が挿入されたメチオニンコドンの場所で始まることだけが異なる。

組換えDNA分子 pK KープレねuTFね及びpKKー huffa を、その中に含まれる構造遺伝子によりコードされるねuTPh

た。それからこの選択したトランスホーマントをクローン化し、 モノクローナル抗体TF8-3G9を用いて、発現するプレ カuTFhタンパク質の存在を各クローンについて検定して、 pSV-プレhuTFhの存在に関する選択を行った。 4. CHO細糖におけるhuTFhの発理

本乳類細胞において、huTFhを発現することができる組換えDNA分子を、例16c由来のpSV-プレhuTFhを、期限エンドスクレアーゼBslIで消化することにより構築した。生成した1153bp 既片をサイズ分面で早難し、つづいて、期限エンドスクレアーゼBbvIで減化した。生じた974bp 所片は、図2の残器164-1125番の配列に対応するスクレオチドアダプター配列を含み、これを、サイズ分面により単級した。

先に述べた方法で、

5'-GATCGACATGTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATT-3',

3'-CTGTACAGTCCGTGATGTTTATGACACCGTCGTATTATAAATIG-5'.
の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアグプター断片を合成し、アニールして、結着性Bgl I 及びBbv I 末端を含む二本頃 D N A リンカー断片を作った。ついで、このリンカーをT 4 D N A リンカー断片を作った。ついで、このリンカーをT 4 D N A リガーゼを用いて 9 7 4 bp 断片に線路的に結合して、第2図の残器 1 3 0 ~ 1 1 2 5 番の残茎の配列に対応するヌクレオチド配列を含む、1 0 1 8 bp 断片を作った。

プラスミド免現ペクター pKSV-10を、Bellで消化して 鉄伏とし、ついて、TIDNAリガーセを用いて、1018 bp 断片に改能的に結合し、環状組換えDNA分子 pSV-huTF b を作った。

組換え口NA分子 pS V - プレカロTPカ及び pS V - huffh

又はプレトuTFトの発現に適合する原核性宿主媒体に導入した。 そのような商主媒体の代表例は、大場面RRI株である。この宿 主を、組換えDNA分子でトランスホームし、細胞増殖とこの組 換えDNAの発現に適合する条件下で培養し、この発現したタンパク質を従来の技術を用いて収穫した。

c. CHO相取におけるプレカロプアカの発現

脊柱動物和腹中、プレトロTFト遺伝子を発現できる組換え DNA分子を例16aで網製した1133bp 断片を用いて接続 した。

カルーザース (Carethera)等及びゲイト (Gait) 等の方法 (上記) を用い、

S'-AATTCCCGGG-3', MU

5'-GATCCCCGGG-3'.

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター販片を作った。
ついでこのオリゴヌクレオチドアダプター膨片を、ロザースタイン(Retherstein) 等の方法(メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods is Enzymol.) 6 8 巻、9 8 質(1979年))を用い、1133bp 断片の各末端に結合し、元×1133bp 断片に存在する BcoR 1 枯滑末端を、BgI I 粒潜末端に転換した。 真核性シミアンカイルス(SV 4 0)を基本とする発現ベクター、pK SV - 10(NJ、ピスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社)を、制限エンドヌクレアーゼ BgI I による情化で制状化した。1133bp のBgI I 適合断片及び、BgI I 情化ベクターを、T 4 DN A リガーゼを用いて、機能的に結合し、環状証拠え DN A 分子 pS V - ブレ h u T F h を作った。

大馬蘭RR1を、 pSV-プレトuTFトでトランスホームし、 アンピシリン耐性のトランスホーマントを選択し、クローン化し

を、内在する構造遺伝子によりコードされるhuTFh又はプレ huTFhタンパク質の発現するのに適合した実体性宿主媒件中 に導入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、CRO 細胞がある。

店主を、組換えDNA分子でトランスフェクトし、安定なトランスホーマントを従来法で選択した。例えば、グラハム(Graham) 等、ピロロジー(Virol.)、52 巻、456 頁(1973年)及びサウザーン(Southern)等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス (J. Hol. Appl. Genet.) 1 巻、327~341 頁(1982年)参照。トランスホームした宿主初助を、知助増殖及びその組換えDNA発現に適合した条件下で培養し、発現したタンパク質を、従来法により収穫した。

e. イーストにおけるプレトuTPトの発現

S. セレビシアエ(cerevisiae) において、プレカ u TPカ 遺伝子を発現できる緑頂え D·N A分子を、先に述べたように、

5 ' - A A T.T C.C C G G G - 3 ', RU

· 5'' - CGCCCGGG-3',

の配列をもつオリゴヌクレオチド、アダプター断片を合成し、ついで例16 a の1133 b p 断片の末端に、それを結合することにより構築した。このようにして作ったアダプター化した断片は、Clai粘着末端をもつ。

・イーストの発現ベクター、 pTDT1 (アメリカン・タイプ・ティシュコレクション、 # ATCC31255) を、制限エンドスグレアーゼClaiでの消化により級状化した。上記のClaiアダプター化1133bp. 断片及びClai消化ベクターを、T4DNAリガーゼを用いて、線能的に結合し、環状の組換えDNA

分子ョソープレカロTFカを作った。

大陽閣RRIをプレカuTPカでトランスホームし、プレカuTPカ構造遺伝子を発現するトランスポーマントを、例16cで述べた方法により同定及び選択を行った。

・!、イーストにおけるhuTPhの発現

S. セレビシアエ(corevisiae)において、huTFh接達 建伝子を発現できる組織人DNA分子を、pY-ブレhuTFh の Cla!による消化により、第2回の残益1~1135番の区列に対応するヌクレオチド区列を含む1151bp 断片を作ることで排放した。サイズ分類による単類後、1151bp 断片をBbv lで情化し、第2回の残益154~1125番の区列に対応するヌクレオチド配列を含む978bp 断片を作った。この978bp 断片は、サイズ分類により単類した。

5'-CGGACATGTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATT-3',
B IF

3'-CTGTACAGTCCGTGATGTTTATGACACCGTCGTATATTAAATTG-5',

の民列をもつ合成はリスクレオチドアダプター町片を作り、先に述べたように、アニールすることで、CIOI及びBbv I 粘着末端をもつDNAアダプターを作った。まず、このアダプター断片を、978bp 断片に似線的に結合することにより、I 0 2 0 bp 断片とした。つづいて、この1 0 2 0 bp 断片を、T 4 DNAリガーゼを用い、例16 e で述べられているように嗅製した CIoI i i i 化pT DT I ベクターと結合し、環状組換え DNA分子 pY - h u T P h を作った。

超換えDNA分子のYープレカuTFA及びのYーAuTFA を、内在する構造遺伝子によりコードされるカuTFA又はプレ カuTFAタンパク質の発現に遺合するイースト宿主媒体中に導

17. ポリペプチド p 2 4 - 3 5 及び p 1 5 9 - 1 6 9 による凝集 ・服害

第7支にそのアミノ酸残益配列を示した例11で送べたように 合成した。

第 7 表

ペプチド名

アミノ政烈荼配列

p 2 4 - 3 5

B - TYPOKYYNANA - B

p 1 5 9 - 1 6 9

H - ITTLYYHKSSSSGKKTAK - OH

a. 各ポリペプチド実験名は、第1図に含まれているアミノ酸残 本配列を集わしている。

それから、ポリペプチド p2 4-35及び p153-189について、例12で述べられているように、huTPによる凝集開始を総合的に阻害する能力を検定した。この研究の結果を第12図に示し、p2 4-35及び p159-16.9は、10 p M 温度で用いたとき、各々、huTPで開始した發展を、45 M 及び25 M 田舎できることを示している。この研究において、第12図で白丸により示したこれらペプチドに対する阻害バックグランドは、第4選で示した実験結果よりも低いことに注意しなければならない。結果として、この研究において、10 p M 遺底での發無阻害を少なくとも20 M 起こすポリペプチドは、huTP 社合部位ポリペプチド類似物と考えた。

従って、ポリペプチド p 2 4 - 3 5 及び p 1 5 8 - 1 6 9 は本発明の h u T P h ポリペプチド結合部位頻似物を示している。 皮た、ポリペプチド p 2 5 - 4 9 で得られた同様の結果を考慮すると、 p 2 4 - 3 5 で得られた結果は、 h u T F h - 因子を / VI a 結合部位は、これら 2 つのポリペプチドの共通部分、すなわち、

平成 7.12.20 発行

入した。このような媒体を含む宿主知胞の代表例には、S. セレビシアエ (cerevisiae) 相関がある。

宿主協助を、この組換えDNA分子でトランスホームし、選択 培地で培養して、従来法により、トランスホームした初随を単離 した。例えば、ハイネン(Blanen)等プロシーディング・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Watl. Acad. Sci.)USA、75巻、1929頁(1978年)及び、ミヤジマ(HiyaJina)等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) 4巻、407頁(1984年)参照。トランスホームした細胞を、細胞増殖及び組換えDNA発現に適合する条件下で培養し、ついでこの発現したタンパク質を従来法で収録した。

g. 超換えカロTドカコード配列の発現による可移性なロTPh の生産

超換えDNA分子からの可溶性トuTPトの発現は、プレトuTPト及びトuTPトに対し、例16で述べたのと同様に、 複々の発現媒体で行なわれた。その例において、BcoRI特務末 協を有する所片を含む1133bpのプレトuTPト構造遺伝子 の例16aでの作成と、つづいて、例16bー『での操作で、大 随園、S. セレビシアエ(cerevision)及びCHO細胞の3種 の発現媒体において、プレトuTPト又はトuTPトを発現でき るベクターを作った。同様に、BcoRI粘着末端を有する可溶性 プレトuTFト構造遺伝子を含み、例16aで調製した805bp の断片を例16b~『で述べた方法に従がって操作し、これら同 発現媒体中可存性プレトuTFト又はトuTFトー 取べクター(すなわち、プレトuTFトーTR又はトuTFトー TR)を作った。

第1回で示した残蓄30~35、 (一VNQVYT-) のアミノ 酸残毒配列で作られていることを示していることに注目すべきで ある。

18. 抗カロTF抗体による凝集阻害の速度論

抗huTF抗体が、huTFの凝集開始を阻害できる時間を測定するため、この阻害の時間経過を、例10で述べた限害検定法を用いて測定した。

例7で述べたように摂製した、MAPS早離化TP8-5G9モノクローナル抗体およモ1ngを、100μgHBS/TBS中、例4で述べたように摂製した再覧質化huTPおよモ1ngと混合した。このように形成した複本の混合物を、37℃で、約1から60分の間の値をの時間維持し、抗huTP抗体を、huTPと免疫学的に結合させ、免疫反応度物を作った。第13図で示した時間に、各混合物について、例2で述べたように、huTPの群血活性を検定し、ついで、例10で述べたように阻害率を示した。

第13図で、このような速度論的測定の結果は、この検定で用いた抗体及び特製したhuTFの過度で、65%以上のhuTFによる凝集開始の阻害が、10分以内に起こることを示すことが分る。より高い抗huTF抗体濃度では、より速く、完全な阻害が起こると考えられる。

19. 抗huTF抗体による、huTPによる凝氣開始阻害の投与 一応体

抗体投与範囲にわたる、huTF 凝集開始を限寄する本発明の抗huTF 抗体の能力は、次の修正をした例で述べた方法により 検定した。例4で調製した再脂質化huTF1naを、0.1pg のHBS/BSA中、例7で述べたように単細した、種々の量の TF8-509モノクローナル抗係と混合した。このように調製した複合物を維持して免疫反応虚物を作り、つづいて例10で遊べたように、huTPの凝血活性に関する検定を行った。

そのような役与一応答検定の結果を、第14回に示し、また、このことはこの研究で用いたドロTF隣接に対し、 m m m m が よそ 1 ~ 5 m m の抗 h u TFでの最高値の半分の限答を示している。

同様の投与一応答実験を、カロ丁P瀬として溶解したヒト細胞を用いて行なった。

セトの線線穿細胞系列CM1381 (NIGMSヒューマン・ジェネチック・ミュータント・セル・レポジトリー) を、2mM グルタミン、5 Mカン胎児活性及び抗生物質を担った、グルベコ修正イーグル培地 (DMEM、NYH、グランドアイランド、ギブコラボラトリー) 中、37℃で、7%(v/v) 二酸化炭素空気雰囲気下で培養した。GM1381細胞を増殖し、そして収穫し、さらに30×10・個の細胞のペレットを進心で調製し、一70℃で凍結した。この凍結ペレットをHNバッファ(25mM ペペス、140mM NaC4、pH7.0) 中の15mMペータ、オクチルグルコピラノシド溶液 9 a 2 を加えて急速に配解し、さらに10分間37℃に維持して、細胞を溶解した後、HN18 a 2 を加えて、細胞溶解物を作った。

例17で述べたように単離したモノクローナル放供TP8-5G9を、第15回に示した種々の投与に対し、0.01%BSA(シグマ、RIA級)で特款した。それから各抗体発款物25μ2に、先に調整した糖胞溶解物225μ2を加え、60分間37でに保って、抗体を細胞溶解物中に存在するカロTPと免疫反応させ、免疫反応度物を形成させた。その後、25mM CaC4,

ーション液合物100μ 8を、50μ 8のヒト因子11欠損血漿及び50μ 8の50m M CaC 8 1 に添加することにより測定した。37で、1分後、相同種の血清の10倍粉収物50μ 8を因子11減として加え、凝血形成時間を2度測定した。

24個のM。Ab のうちの18個がパブーン脳下ド又は、アフリカ・ミドリザルな協知的抽出物のプロコアグラント活性を阻害した(第8表)。しかし、M。Ab のいずれも、ラット、ウサギ、子ウシ、イヌ、牟又はブタのTドと、交差反応を示さなかった。すなわち、相同的因子以源の存在下、ヒト因子以欠失血器のリカルシフィケーション時間促進能を示すTド調製物ではなかった。 流体のいずれも、正常なヒト血張での検定による、ウサギTPのコアグラント活性を示さなかった。 平成 7.12.20 発行

50 μ ε を、免疫反応度勢を含む溶液 50 μ ε と混合し、ついて、50 μ ε のクエン酸化ヒト血漿と混合し、設集を開始させた。このようにして作った混合物を 37 でに維持し、血法の添加と、凝血形成の間の時間を制定した。効果的 h u T P 種度及び限害率を例10 に述べたように計算した。

トuTF減として、ヒトGM1381相脑溶解物を用いた投与 - 応答関客検定からの結果を、第15回に示した。これらの結果 は、TF8-5G9抗huTF抗体が、mg当り、およそ8-10ngの抗体環度でhuTFのこの細胞溶解液の半分の阻害を 起こしたことを示している。

20. 非ヒト組織因子とMOAbの交差反応性

は機因子を、超組織(ラット、ラピット、子ウシ、イヌ、学、ブタ及びヒヒ)又は、組織培養細胞(アフリカミドリザル胃環(COS)組物)から早難した。組織又は細胞を融解し、親をはぎ、ミンテし、組織1 8当り、1 m4の冷アセトン中でまそジネートし、ついで、規圧下、ワットマンは1ペーペーで超過した。この固体をアセトンに懸濁し、もう5回20週し、一晩空気乾燥したのち、-30でで保存した。関始温度量の16~18%を含むアセトン粉末を細かくしてから、5 m mol/LEDTを含む TBS中、5%(m/v) となるよう懸濁し、緊迫で1時間混合した。10.000×8、20で、30分間の違心で固体を集め、ついて下含有膜を100.000×8、1時間の上常の違心で集めた。このペレットを、TBSに無調し、-80でに保存した。

動物TP(TP活性をもつ組組織抽出物)による抗体障害を、次のように関定した。等容量のTP(1 m/ml)及びハイブリドーマ上清(TBS/BSAでの10倍級物)を、37でで2時間インキュベートした。残存するTP活性を、そのインキュベ

第 8 表

NoAb	57 80	動物 <u> の阻害</u>
TF8-5C4 1sC1. # 6242 + ± + 96	57 80	の阻害
1	80	
	80	
178-369 [gG], # 28587 + - + 99		
TF8-11D12 [eG1. # 29453 + - + 99	82 '	• • • •
TF9-1F1	83	n. 3
TF9-105 /eG1. # 3872 + + + 95	76	n.3
TF9-137 1gG1. # 28586 + + + 97	90	M. 3
TF9-188 1gG1, # 28552 + + + 98	83	n. 3
TP9-189 IgG1. # 28523 + + + 97	84	H. 3
TF9-2C4 - IgG1, x 24435 + + + 97	78	и. 3
TF9-2F5 1461. * 27422 + + + 97	79	M. 3
TP9-4011 TeG1. # 25994 + + + 97	81	n. 3
TF9-564 IgG1, # 24073 + + + 97	83	8.8
1F9-5B7 1gG1. ≈ 25819 + + + 97	74	n.3
TF9-5C7 IsG1. # 24543 + + + 96	72	Ħ.3
TF9-684 1461. # 17894 + + + 96	98-	и. 3
TF9-664 [461. # 24065 + + + 95	78	n.3
TF9-6C9 IEG1, # 8054 + '+ + 95	47	
TF9-7E10 1.G1.'# 8025 + + + 97	54	
TP9-883 [aG]. = 29152 + + + 97	76	n.3
7F9-9E1 faG1, # 18169 + + + 90	71	н. 3
TP9-9C3 1gG1. # 30222 + + + 97	82	n.3
7F9-984 1gG1, # 33728 + + + 95	82	и. 3
1F9-10C2 aG1. # 2B692 + + + 98 -	71	H. 3
TP9-10H10 IEG1. # 24585 · · + + 0	20-	
PAb100 /eG, # 1929 0	0 *	

2. 運元 (R) 又は非選元 (NR) のTPを用いて行ったウェスタンブロット。

3. 精製したヒトの留TPによって誘導されるヒト血漿の凝結の 関係。

4. J82 招助に対する特異的 ***! - 因子VI/VI * 符合の阻害。

5. 相ヒヒ協抽出物 (B) 又は溶解 COS 細胞 (M) により誘導されるヒト血殊凝集阻害。 M o A b が 6 0 %以上の凝血物性を阻害するとき、文字がその様の場所に入れられている。

種々のヒト組別及び組織により発現される液血活性の関客をMoAbTF8~5C9を用いて詳細に試験した。TP8~5C9は、IsG遺度≥1μs/skのときの90%以上、精製再型質化したヒトTPの機能を中和する(第16図)。ヒトの細胞溶解物及び相組機械出物の凝血活性を顕著する、このMoAbの能力も示されている(第9度)。10μs/skのIsG速度でのTP8~5C9は、相間及び胎型の下セトン粉末及び溶解したヒトの繊維芽細胞、膀胱がん細胞及び内毒素活性化末梢血液単核細胞の凝血活性の80%以上を定量的に顕客する。

ナル・オブ・パイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、2 6 2 巻、1 1 5 9 2 (1 9 8 7 年)。 従って、相談表面 boff: Vi / Vi a 複合体会合に関するM o Ab の効果は、J 8 2 相談を、 沈休とプレインキュペートし、さらに、 ***! - 因子Vi / Vi a の 特異的結合を定量することにより試験した。

J82細胞を12穴培養プレート中、フェア(Pair) 等によ って報告されているように(上述)、集密化するまで培養し、パ フファA (137mM NaC&、4'mM KC&、11s not -レーグルコース、5mMアジ化ナトリウム、10mMへペス、 pH 7.45) で洗浄し、ついで、精製したMoAb IgC又は、 ハイブリドーマ培養上清10倍希釈物を含むパッファA0.7m& とともに、37℃で2時間インキュペートした。塩化カルシウム 及び、 imal ~因子なノほaを各々、最終濃度5mM及び1nM となるよう添加し、さらに37℃、2時間インキュペートした。 その後、お腹阜原を、冷パッファB(1 4 0 mM N m C & 、0.5 ** B S A 、 5 m M トリスHCR、 pH 7. 4 5) で 5 回洗浄し、 1 me O O 2 M Na O H 、1 % S D S 、1 0 m M B D T A ig it 中 で溶解し、その溶解物のガンマ線をカウントした。特異的結合は (非ラベル因子VI/VIaを100倍過剰存在下、細胞と会合する 125 | 因子VI / VI a)、非特異的結合放射活性を差し引いて測定 した。特異的結合の阻害率は9容のパッファAと、1容の特養培 地で処理したコントロール細胞に対する、M o Ab で処理したJ A 2 胡肋という形で阅定した。

因子WノV』がTFに結合したとき、それはうまく取り込まれないが、抗体結合によるTFインターナリゼーションの可能性を除くため、JB2和胞を、5mMフジ化ナトリウムで代謝的に再致した。初胞のアジド処理の有無にかかわらず同じ結果が得られ

モノクローナル抗体TF8-5G9による、 種々の細胞及び組織の磁血活性の風害

TP活性源	TP語性(M題客) 抗体なし PAbloG TFB-569						
排製ヒト端TF	1569	1520	(3%)	245	(84%)		
祖廷抽出物	2059	2059	(02)	411	(801)		
租胎登抽出物	1287	1344	(02)	159	(882)		
GN1381機維芽組版 (溶解化)	990	965	(23)	143	(86%)		
ヒト単雄 (溶解化)	2893	2745	(52)	176	(342)		
J82 膀胱がん細胞 (寝解化)	882	902	(01)	93	(892)		
ウサギのトロンボプラスチン	2106	2108	(01)	2157	(02)		

- 1. 精製したヒト脳TFを、テスト前にリピロトピヒクルに再構 成した。
- 2. 右の2つの値は、指示されている物製!&Gで処理した後例 定した、ミリユニットで表わした残留TP密性の2回の平均値 が示されている。残存するTP密性の別定前、サンプルを3? でで20分間、10μg/ madの1&Gとインキュペートした。 カッコ内の値は、抗体なしの同サンプル密性ユニットに対する・ 服容率が示されている。

21. 因子77枯合の研究

因子リノVIsのTPへの結合は、機能性TP:VI/VIs 裁無促 遊猿合体の集合に必要とされるので、因子VI/VIsのTPに対す も結合を妨げることによる、第8表に示したMoAbのTF活性 中和能がテストされた。

ヒトの組織因子仲介による、因子VIのJ82の膀胱がん報粒変 面への結合はよく頃べられている。フェア(Pair)等、ジャー

た。

いこの研究の特別は、上の第8表に示されている。TF活性を図客する全ての23個のM。Abは、因子V/VI。結合も図事した。 予想されるように、TF活性を図客しないM。Ab、TF9-10H10は、因子Vの結合を図客しなかった。

22. J 8 2 細胞による因子× 3 形成の阻害

J82組践上でのカロTP:M/Ma複合体による因子Xa形 成速度を、次の修正をした、フェア (fair) 等(ジャーナル・ オブ・パイオロジカル・ケミストリー (J. Blot. Chem.) 、 2 6 2 巻、 1 1 6 9 2 頁(1 3 8 7 年))により報告された、多 穴培養プレート検定法を用い2度定量した。細胞を、12穴プレ ート中で培養し、J 8 2 紀胞への因子VI/VI a 結合の際に上述し たように、検定開始前、種々の濃度の精製した、MoAb のIsで 面分と37セで2時間プレインキュペートした。単一の濃度の因 子り1ノ2日a(1mM)を検定で採用した。因子Xを最終濃度50 μ g / a.1 となるよう添加した後、5 、10 、15 分の間隔で、 5 0 μ 4 の上流を採取し、5 5 0 μ 4 の 5 0 m M トリス・HC 4 、・ 2 2 5 m M ' N a C & 、 5 0 m M E D T A (pH 8.2) の溶液中 に入れた。発色性因子Xa莶質添加後(TX州、ビューモント、 ヘレナラブ社、3.4 m M S - 2 2 2 2 5 0 μ M)、速度論的分 祈モジュールをつけたベックマンD U -30分光器で405nm の吸光皮の増加を測定することにより、因子×の活性を定量した。 因子VI/VI。非存在下でインキュベートした」82拍助上滑のS - 2222加水分解によるパックグランドを各側定値から変引い た。抗体処理の阻害率は抗体とのプレインキュペーションなしの 組 胞に対して計算した。

M o A b T F 9 - 2 C 4 及びT P 9 - 5 B 7 による J 8 2 細胞

盛行

23. h u T F h ポリペプテドの因子 W / W a への競合的結合による、J 8 2 相談上での因子 X 活性化の顕字

当分野ではよく知られているように、孤血促進プロテアーゼカ スケードの相談活性化は、消費性血栓出血症と呼ばれる種々の病 気と関連している。一般に、磁血促進プロテアーゼカスケードは、 腹レセプター及び基本的共因子、領路因子 (TF) に対する因子 W/Waの高い規和性による発見により、細胞表面で開始する。 TP及び因子は人はaの二分子森庭促進複合体(TP:ほ/Wa) は、最終的にトロンピン形成及びフィブリンの折出につなかる限 定したタンパク賞分解による因子X及び以の活性化を起こす。さ らに、森直におけるTPの役割、TFによる森集プロテアーゼカ スケードの開始は、機種性血管内疑固及びトロンポジェネシスと(関連する。ニーメツ (Hisactz)等、ブラッド (810od) 4 2 巻、 . 4 7 頁(1 9 7 3 年)及びベビラクア (Bevilacqua) 等、ジャ ーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Hed.) 、 160毫、618頁(1984年)。TFは、炎症性仲介物に対 する応答及び胡精性免疫応答で、単球及び内皮細胞の表面で碌却 する意要なエフェクター分子である。

本発明のhuTFAポリペプチドが、因子リノVIが応結合し、 それにより、因子Xを活性化することができる、TF:VI/VIが

・ 第10表 huTPポリペプチドを用いたJB2 相胞に関するX活性化の磁害

	•
カロTFボリペプチド	光学密度
PBS.	0. 9 6 0 ± 0. 0 8 3
因子な/VTaなし	0. 0 0 5 ± 0. 0 0 1
p 1 - 1 8	1. 0 0 7 ± 0. 0 8 7
p 1 - 3 0	1.098±0.028
p i i - 2 8	0. 8 8 7 ± 0. 0 7 1
p 2 4 - 3 5 .	0. 4 7 7 ± 0. 0 1 7
p 2 6 - 4 9	0. 4 3 7 ± 0. 0 2 0
p 4 0 - 7 1	0. 8 1 4 ± 0. 0 5 3
p 7 2 - 1 0 4	0. 7 8 1 ± 0. 0 4 T
p 9 4 - 1 2 3	0. 8 1 8 ± 0. 0 5 5
P 1 2 1 - 1 5 5	· 0.889 ± 0.067
p 1 4 4 - 1 5 9	0. 5 0 7 ± 0. 0 5 3
p 1 4 6 - 1 5 7	0. 0 0 4 ± 0. 0 0 1
p 1 5 7 - 1 6 9	0. 3 8 9 ± 0. 0 3 S
p 1 6 I - 1 9 0	0. 6 0 0 ± 0. 0 2 3
p 1 9 0 - 2 0 9	0. 6 2 5 ± 0. 0 3 1
p 2 0 4 - 2 2 6	0: 7 1 5 ± 0. 0 4 2
p 2 4 4 - 2 6 3	0.619±0.047

もし、光学濃度(O.D.)が約0.500以下なら、因子Xの活性化の阻害は有食であると考えた。

本研究の結果は、huTPhポリペプチドp24-35、p26-49、p144-159、p146-167及びp157-

- 169は、因子VI/VIaに結合し、因子×を活性化できる、TF
- : VI / VI a 複合体の形成を阻害することを示している。これらの

複合体の形成を阻害する能力を研究した。

TBS中、100μ M の h u T F ポリペプチド類似物を含む溶液50マイクロリットル (μ &) を、96六平底ポリスチレン検定プレートの各ウェル96個に入れ、ついでその各ウェルに、例3で述べたように単離した、TBS中1m M の速度に調整した因子はブリッを含む溶液25μ & を加え、さらに、TBS中20ml の塩化カルンウム25μ & を加え、その減合物を30分間重温に維持した。

ヒト酸脱がん細胞 J 8 2 細胞を、アノリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC HTB1: MD州、ロックピル)から入手し、参考としてここに超込まれているフェア (Pair) 等の方法 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー)、262 巻、11892-11698頁 (1987年))に従って培養した。

50 m # の T B S に 5 × 10 ° 個の J B 2 細胞を想謝し、上述の精神を行った後、ポリスチレン検定プレートの各ウェルに入れた。その後、ただちに、フェア (Pair) 等の報告のように (上述) 草離した、T B S 中 100 n M の遷度の因子 X 25 m # 及び、X a 発色蒸賞 S - 2 2 2 2 (1 m / m # T B S) 50 m # を加え、混合し、その混合物を 2 分間変濃に維持して、発色反応度物を含む溶液とした。

生成した発色度物量を、V-aax 96 欠スペクトロホトメータ (カリホルニア、マウンテン・ピュー、モレキュラー・デバイス 社)を用い、405 ナノメーター (nm) での光学密度 (0.p.)を図定して定量した。ポリペプチドの代りにTBSを用いるか、又は、因子は無添加のコントロールも測定し最高及び最低OD値を快定した。これら阻害の規定結果を第10表に示す。

結果は、本発明のhuTF結合部位ポリペプチド類似物が發業を 顧客するのに用いることができることを示している。

24. 抗 h u T P h M o A b による凝集の生体内での阻容 ·

しばしば、グラム除性相関による腐敗症は、最終的に死に至ら しめるショック状態を起こす。このヘモスクチスシステムの乱れ は、このショック状態の展開と密接に関係している。テイラー (Taylor)等(ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション(J. Clin. Invest.)79巻、918~825頁 (1987年))は、外的に加えられた活性化した、タンパク質 C、天然の抗截直輝素、は、凝集応答及びヒヒにおけるしD。。 の大調管温度の致命的効果を妨察する。

本発明の抗聚集M o A b の生体内における最無限容能力を、デイラー(Taylor)等(上述)によって報じられた腐敗ショックのヒヒモデルを用いて試験してみた。重さを計った了~8 のヒヒを実験前一塊絶食し、実験の朝、ケタミン(筋肉性射、1 4 m/ bg) で免疫化した。ついで、ペントバルビタール位ナトリウムを、級皮カテーデルを選し、頭の静脈に投与し、軽いレベルの外科的麻酔は結に維持した(約45分毎2 m/ bg)。大腿部静脈を送込んだ。 法皮カテーデルは大腸歯及び例20で示した、Mo A b T F 9 ー5 B 7 を含む試剤を与え、ヒヒのT P と交差反応させるのに用いた。30分間の平断化時間の後、この動物に約10分間にわたって、Mo A b T F 9 ー5 B 7 500 μ g/bg 又は15 μ g/bg (例7で述べたように単階し、ついで無密生理食塩水に透析し、0.58 μ g/a g の適度としたもの)又は、無関係のMo A b 500 μ g/bg を与えた。

M · Ab 投与及び30分間の平衡化の後、各動物は、LD100

平成 7.12.20 発行

の大腸面の投与を受けた(約101°個、投与後約8~16時間で 敗血性ショックのため死をもたらす量である)。大腸面は2時間 に減り往人により投与した。この研究結果を採11歳に示す。

第11表 .

ヒヒの敗血性ショックによる致死の生体内における阻止

グルーフ	r HoAb	投与ルル	器血,	大路 围住 入	死
1: 3>}0-	F 1F9-5B7	500	Normal	, ok	fo
I., avlo-	s EB*	. 500	Normal-	Yes	Yes
11. 実 1	179-587	500	Normal	Yes	No
	TF9-587.	150	Normai	Yes	No

- 血圧、凝集活性化及びフィブリン分解変物を含む種々のヘモスタチスパラメークは、MoAb 投与後、大陽菌往入前に例足した。
- HBは、TP9-5B7と同じ類及び亜額のMoAbであるが、無関係の抗原と免疫反応を起こす。

第11表にみられるとおり、MoAb TP9-5B7を受けた ヒヒはしDise、の大腸菌の役与に対しても生存しつづけた。Hokb 150月8/12及び500月8/12の阿拉与で保護された。さら に、コアグロバシーと関係する、顕著な低血圧、軽質カスケード 活性化およびフィブリンの分解は、MoAb TP9-5B7を受けた動物で楽しく緩和された。

25. ヘモグロピン・アルファ鎮としての、5 8 kD m h u T P へ テロダイマー軽級の特徴

免疫観和性早間したTFをさらにウェスタン・プロット分析で 特性を調べ、58kD huTFへテロダイマーの成分、すなわち、 例4で述べた47kD。及び12.5kDa タンパク質を同定した。

なるという結論を支持している。

使って、現在、例4で述べられている58kDa ヘテロダイマーの125kDa 軽複成分は、ヘモグロビンのアルファ彼であり、47kDa huTFタンパク質との会合は、huTF単離操作のアーテファクトであると考えられている。

州1~25の結果のまとめと討論

2つの異なる短腔融合体由来の、ヒト間下Pに対する、24種のMoAbライブラリーについて報じられている。各MoAbの免疫特異性は、ドットプロット、ウェスタンプロット及びラジオイムノアッセイにより特徴づけられた。ほとんどのMoAbは、全ての3条件下、ヒトの本来のTP及び変性TPと反応した。MoAbの1つ、TP8-5G9は、TPタンパク質のルーチンな精製にうまく使用することができる。それは組織抽出物由来のTP活性を吸着し、ミリグラム量の精製ヒトプPを一定して与える。

MoAbの1つ以外の全ては、精製したヒト語TFの観覧活性を強く中和する。いくつかのMoAbは、ヒヒ及びサルのTPと交差反応をすることが分っているが、相同的因子はの存在下、ラット、クサギ、子ウシ、イヌ、羊、又はブタのトロンボブラスチンにより開始した因子は欠損ヒト血漿の凝集を、どの抗体も阻害しなかった。さらに、ウサギ語トロンボブラステンによる正常なヒト血族の凝集関抗は、どの抗体によっても阻害を受けず、このことは、ヒトTF暴血活性の阻害は、因子はブリョを含む、可存性血漿凝血クンパク質への抗体の妨害によるものではないという結論を支持する。

抗TPによるTP凝血活性の阻容に対する最も明解な原因は、 因子VE/VE=結合のブロックである。予想されるとむり、全部で 例6 c で述べたように行った、ウェスタンプロット分析を、電気泳動するサンプルとして、例 9 で述べたように複製した、免疫額和性により単難したトロTF、精製したヒトへモグロビン、又は、分子量復増を用いて行った。指示されているところではジスルフィド結合の選元のため、サンプルパッファの中に50mMジチオスレイトールを含めた。ウェスタンプロットを、非免疫化ウサギIEG、従来の方法で調製したウサギ抗トロTF IEG又は、ダコ (Daco) (カリホルニア、サンタパーバラ)社から人手したウサギ抗ヒトへモグロビンIEGを用いて、示されているように免疫反応した。最初の2つの1EG調製物は、例1で述べたように単難したMAPS-ITのる。

上で述べたウェスタンプロット分析の結果は、第18図に示した。抗トロTP IgCは、運元型トロTPの47kDaのパンドとのみ免疫反応を起こし、125kDaのパンドとは反応しなかったが(パネル人、レーン3)、一方、同IgCは、非運元型トロTPの58kDa及び47kDaの両パンドと免疫反応を起こした(パネル人、レーン4)。これらの結果は、58kDaへテロダイマーの47kDa成分としてのトロTPの同定と一致している。抗へモグロビンIgCは、非運元型トロTPチンプル中の58kDaパンドとのみ免疫反応を起こし、47kDaのモノマーとは反応しなかった(パネルB、レーン4)。しかし、抗ヘモグロビンIgCは、運元型のトロTFチンプル中の125kDaパンドと免疫反応し(パネルB、レーン3)また、125kDaの精製したヒトへモグロビン・タンパク質と免疫反応した(パネルB、レーン3)。非免疫ウサギIgCとの反応はなかった。

上記の結果は、非遺元型 h u T F の 5 8 k D a の分子は、ジスルフィド結合でヘモグロビンと結合した 4 7 k D a h u T P から

23個の抗殺血(中和性)MoAbは、TPの基本的レセプター 領語と一致して、J82相数への因子V/VIaの特異的結合を妨ぐ。さらに、このことは、因子VI結合及び、因子Xa形成速度の 阻害のハーフ・マキシマルが同じ1gG強度のときに起こる、選択した精製MoAbの投与滅定においても実証される。

ヒトTFに対するMoAbは、最近、カーソン(Carsoa) 等 (プラッド (Blood)、10巻、490頁 (1987年)) によ り、これを直接試験したのではないが、因子VI/VIII結合の妨害 によることは明白に、TP活性を阻害するものであると報じられ た。24個のここで述べられているMoAbのうちの23個が、 TP活性を強く中和するという知見は注目に値する。 彼のヒト森 ·血タンパク質に対するM o Ab を用いた当出服者の研究室で行っ た実験は、少数の割合のものが機能活性を中和するというもので ある。基本的TPとの交差反応性が合む、反応性が各々異なるこ とから、ハイブリドーマ全てが兄弟クローンであるとは思えない。 さらに、進行中のエピトープマッピング研究は、この種のMoAb に少なくとも3つの別々の非難合抗体結合部位が確認されること ゼ示している。それゆえ、TPに対するM o Ab を中和する大部 分のものは、機能にも関係するわずかな免疫的に便勢なエピトー プによるものでもないらしい;事実、ホブ (Bopp) 等により *(モレキュラー・イムノロジー(Nol. Januanol.) 20巻、483 貝(1983年)) TFのアミノ改配列は、多くの抗凍活定益を 含んでいることが報告されている。

小さいサイズのTFは、なぜ、モんなに多くの抗TF M o A b が因子リノリ a 結合をブロックするのかを部分的に説明している。TFは、 cDNAクローニングにより、グルコシル化を除いて、25kDa の細胞外ドメインをもつことが予想されている。それ

ゆえ抗体及び因子なノVI a 分子は、より小さいTFの相談外Fメインへの結合に立体障害を示しことになる。この立体障害仮説は、TF上の炭化水素質がおそらく機能には必要ないことから(ナカムラ(Fakanera)、トロンポヘモスタチス(Troa. Benost.) 5 8 巻、1 3 5 頁(1 9 8 7 年))、コンカナバリーノAはTP活性を阻害する(ピトリック(Fitlick)ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション(J. Clin. Invest.) 5 5 巻、1 7 5 頁(1 9 7 5 年))という説案と一致する。

それは、種々の細胞及び組織により発現した因子が依存を直活性は、同様の概能をもつ、1つ以上の分子種に考因するということに、いくらか関連している。しかし、MoAb TPB-5G9は根隔及び胎盤抽出物及び溶解した機識券細胞、膀胱が心細胞及び末梢単核細胞の凝血活性を定量的に限害する。完全ではないが、これらの結果は、現にTFに再因する細胞性凝血活性は、同一ではないともも抗原的に関連しているという結論を支持している。このことは、TPに対する単一の遺伝子がおそらく存在しているという知見と一致している。

長近、敗血性ショックの致死効果は、凝血プロテアーゼカスケードにおいて、中間段階での役割を果している抗凝血タンパク質、活性化したタンパク質Cを注入することにより、ヒヒにおいて协ぐことができることが示されている。本研究は、TP汚性を阻害するMoAbは、凝血プロテアーゼカスケードの開始のプロックにより、それらが、血管内凝血の病理学的活性化と遺常関連している、血漿凝血因子の消費を妨ぐので、生体内で、非常に特異性の高い抗凝血剤であることを示している。

例4で述べた58kDa型のAuTFは47kDaのTFタンパク質と、現在では免疫化学的にまた部分的アミノ数配列により、

抗TF抗体との反応で観察された。 5 8 k D m パンドの一部を含む、これらマイナーな分子種は、TPと他の未同定タンパク質問で形成された、混合ジスルフィド結合物を示している。

特別の態様及び例を含む先の明和は、本発明の説明を意図したものであり、これを限定するものではない。多くの他の変化や、 修正が、本発明の精神や範囲を逸脱することなく行うことができる。

平成 7.12.20 発行

へモグロビンのアルファ镇と両定されている、およそ12.5kD。のポリペプチドの、ジスルフィド結合で結合しているヘテロダイマーであることが示されている。58kD。のヘテロダイマーが、早期の途中で形成されているらしいので、58kD。のパンドは、天然の細胞性下ドのヘテロダイマー型であるという以前の推察は誤りであるだろう。

ヘモグロビンのプルファ彼は、1つのシステインをもち、また TFは、 cDNAから、その相談賞ドメインに1つのシステイン を有することが予想される。またT.Pは、細胞外ドノインには 4 個のシステインをもつが、TP糠蛇が選元により失なわれること から、少なくとも2つが鎮内ジスルフィド結合に使われているは ずである。TPの細胞質ドメイン中の1つのシステインは、ほと んどの総数質ゾルタンパク質中のシステインのように、運元型で 建律されているだろう。この(TPの他のシスティンは、ありそ うもない) システインは、細胞溶解後、混合ジスルフィド形成の ため容易にアクセスでき、そして、単離操作間での酸化で、TF ,の細胞質及びヘモグロピンのシスティン間でジスルフィド結合が 形成すると提唱される。この結論は、ヘテロダイマー形成は、明 らかに時間依存性があり、脳アセトン粉末由来のTPの昇間活性 刑抽出と、免疫緩和性マトリックスへの結合との間の時間を小さ くすることが、得られるヘテログイマーTF青を減少させる観察 を支持する。推定される96kDaのTFダイマーも、単離の際 同様のメカニズムで形成するであろう。

次へモグロビン抗体カラムは、3つの5 8 k D a のへテロダイマーを特異的に結合したが、免疫観和性で補関したT F 調製物中に観察できる高分子量種全てを定量的に除くことはなかった。
4 7 k D a 以上の分子量をもつ他の度酵量のマイナーバンドは、

請求の範囲

- (1) ヒトの組織因子重領タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わずか約12,000 Rメクレオチド塩基対を含む DNA断片。
- (2) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残益で 表わされるアミノ酸残益配列を有するタンパク質をコードする、 請求の範囲(1)記載のDNA新片。
- (3) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約918番の 塩基で表わされるヌグレオチド塩基配列を有する、精液の範囲 (2)記載のDNA断片。
- (4) 上記標連進伝子が、第1図の約1番から約219番の残蓄で 表わされるアミノ放残器配列を有する可溶性とト組織因子重類 タンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (5) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約786番の 塩益で表わされるヌクレオチド塩蒸配列を有する、増収の範囲 (4)配数のDNA断片。
- (6) 上記第1の配列の5 * 末端に連続し、かつ上記タンパク質の アミノ末端に結合した、アミノ酸残益リーダ配列をコードする 第2の配列も合み、かつ該第1及び第2のDNA配列がヒト組 機因子重額約44タンパク質をコードする混成構造違伝子を定 養する、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (7) 上記提成構造遺伝子が、第1図の約1番から約263署の残 落で実わされるアミノ放残器配列を有するタンパク質をコード する、請求の範囲(6)記載のDNA断片。
- (8) 上記環成構造遺伝子が、第2図の約3 6番から約91 8番の 塩蓄で表わされるスクレオチド塩蓄配列を有する、緯状の範囲 (7)記載のDNA断片。

- (9) 上記協成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約219春の残益で表わされるアミノ放残益配列を有する、可容性にト組織日子重額タンパク質前駆体をコードする、請求の範囲(6)配数のDNA版片。
- (10)上記読成構造遺伝子が、第2図の約34番から約786番の 塩益で表わされるスクレオチド塩差配列を有する、請求の範囲 (5)記載のDN人断片。
- (11)ヒト組織因子重額タンパク質をコードする構造遺伝子を定義 する第1のDNA断片に機能的に結合したベクターを合む組換 えDNA分子。
- (12)上記錄遊遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残器で 表わされるアミノ酸残器配列を有するタンパク質をコードする、 時項の新聞(11)記載の組役人DNA分子。
- (13)上記構造遺伝子が、第2図の約130番から約918番の塩 さで表わされるスクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (11)記載の銀換えDNA分子。
- (14)さらに、上記第1の断片の5、末端に速接し、かつ上記タンパク質に結合した、アミノ酸残器リーダー配列をコードし、かつ放第1及び第2のDNA断片が、上記タンパク質の前駆体をコードする混成構造建伝子を定義する、緯求の範囲(11)記載の超額えDNA分子。
- (15)上記混成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約263番の残器で表わされるアミノ酸残器配列に対応するアミノ酸残器 配列を有する、上記タンパク質の前額体をコードする、鏡水の 範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (16)上記張成構造遺伝子が、第2回の約34等から約918巻の 塩基で表わされるスクレオチド塩基配列に対応するスクレオチ

(25)

H-SGTTNIVAAYNLIWKSTHFKTILEWEPRPV-OH,
H-TKSGDWKSKCFYTTDIECDLIDEIVKDVKQTY-OH,
H-ECDLIDEIVKDVKQTY-OH,
H-ECDLIDEIVKDVKQTY-OH,
H-YENSPETTPYLETNLGGPFIQSFEQVCTKV-OH,
H-OAVIPSKTVHKKSTDSPUC-OH.

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位 ポリベプチド類似物。

(26)a)ヒト組織因子重領タンパク質と免疫反応し、

b)

R-ZEKPVNQVITVQISTKSGDWKSKC-OH,
R-VIGKDLIYTLYYWKSSSSGTKT-OH,
H-SSSGKKTAKTINTEFLIDVDKGTMYCFSV-OH,
H-SGTTMIVAAYHLIMKSTHFKTILEWEPKPV-OH,
H-KSGDWKSKCFTTTDTECDLIDEIVKDVXQTY-OH,
H-KSGDWKSKC-OH,
H-ECDLIDEIVKDVXQTY-OH,
H-ZLRVFSYPAGNVLSTGSACIPLYLMSPETFFYLC-OH,
H-YINSPETFFYLETHLQPTIQSFEQVGTKV-OH, BU
H-QAVIPSRTVMRXSIDSPVEC-OH, BU

からなる群から選ばれた式で扱わされるポリペプチドと免疫反応し、かつ

- c) 第1回の第204巻から第226巻の部位で示される式 で表わされるポリペプチドと実質的に免疫反応しない、
- 抗体分子を含む、抗体組成物。
- (27)上記抗体がラベルに結合している、請求の範囲(26)記載の基 成物。

平成 7.12.20 発行

ド塩香配列を育する、情境の範囲(15)記載の組換えDNA分子。

- (17)上記ベクターが上記第1及び第2のDNA断片の複製を指揮 しうる、観求の経題(11)記載の組織丸DNA分子。
- (18)上記ベクターが、商生知助中、上記タンパク質を発現しうる、 静攻の範囲([1])記載の組換えDNA分子。
- (19)上記ベクターが、宿主細胞中、上記前駆体タンパク質を発現 しうる、鏡状の範囲(14)配数の組換えDNA分子。
- (20)上記ベクターが、pKSV-10であり、かつ、上記提成構造遺伝子が、可得型の上記前駆体タンパク質をコードし、かつ、第2図の34者から786者の塩器で表わされるスクレオチド記列を有する、請求の範囲(19)記載の組換えDNA分子。
- (21)わずか約50アミノ改残器を含み、かつ、

- THOUTTOOIST - . BU

- LYYWESSSSERT -

からなる群から選ばれた式で衰わされる配列に対応するアミノ 改残益を含む、ヒト組織因子結合部位ペプテド環似物。

(22)上記ポリペプチドが、式:

HO - TRIGUTY POIST - OH

で要わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(23)上記ポリペプチドが、式:

B - LYYMKSSSSCKET - OH

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(24)

H-EPKPUNQYYTYQISIKSGDMKSKC-OH, H-VFGKDLIYTLYYMKSSSSGKKT-OH, &U H-SSSGKKTAKTHTHEFLIDVDKGENYCFSV-OH.

からなる群から選ばれた式で臭わされるヒト組積因子結合部位 ポリペプチド類似物。

- (28)上記抗体が、生理学的に許容しうる希根剤中に存在する、 球の題囲(26)記載の抗体組成物。
- (29) ヒト組織日子並貸タンパク質及び第1図の25番から49番の残盗で示される式で扱わされるポリペプチドと免疫反応する 依体分子を産生する、TF8~5G9と命名されたハイブリド
- (30) 請求の範囲(29) 記載のハイブリドーマにより産生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (31) ヒト組織因子重領タンパク質及び、第1図の第28番から第49番の残蓄で示される式で変わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TFS-10H10と命名された、ハイブリドーマ。
- (32) 請求の範囲(31) 記載のハイブリドーマにより産生される抗体 分子を合むモノクローナル抗体観成物。
- (33) ヒト組織因子重換及び、第1回の第146番から第167番 で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分 子を産生する、TP9-6B4と命名した、ハイブリドーマ。・
- (34) 額求の範囲(33) 記載のハイブリドーマにより度生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (35)。) 身体サンアルを、ヒト組織因子重復タンパク質と複合し、 免疫反応複合物を作る;
 - 的この混合物を、上記抗体がサンプル中に存在するヒト組織 因子と免疫反応し、免疫反応度物を形成するのに十分な時 間維持する、そして、
- c)ステップ b) で生成した免疫反応度物の存在を検定する、 以上、a) ~ c) のステップを含む、体液サンブル中のヒト組 、改因子重貨タンパク質の存在を検定する方法。

- (36) a) 生理学的に許容しうる希釈剤及び、血栓中に存在するヒト 組織因子と効率よく免疫反応する、生体内指示手段と結合 した、ハイブリドーマTP9-10月10によって産生される、ある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物 を彼後者に静原投与する。
 - b)上記投与を受けた被検者を、上記抗体分子が、血栓の一部 として生体内に存在する組織因子と免疫反応し、免疫反応 度物を形成するのに十分な、予め決められた時間維持する; そして、

c)ステップb) で生成した免疫反応風物の存在を検定する、 以上、a) ~ c) のステップを含む生体内の血性を検出する方 法。

(37) 存在するとト組織因子と効率よく結合する、TP8-509. 及びTF9-684からなる群から選らんだハイブリドーマによって度生される、ある量の抗体分子を含有する生態学的に許容される希釈剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被検体に静脈投与することを含む、生体内におけるヒト組織因子の凝血因子はノゼェへの結合能を中和する方法。

(38)組成物中、因子は/11 a と効率的に結合する量の、

H-EPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKC-OH, H-VIGKOLIYTLYYWKSSSSGKKT-OH, AD H-SSSGKKTAKTNTHEFLIDVDKGENYCFSV-OK...

からなる群から選ばれたポリペプチドを、含有する生理学的に 許容された希釈剤を含むポリペプチド組成功を被役者に診験投 与することを含む、生体内におけるにト組織因子の凝血因子で / Va = への結合を阻害する方法。

(39) a) 請求の範囲(22)記載の抗体組成物を含有するパッケージ

求の範囲(42)記載の組成物。

(45) a) 少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒト組織因子経質タンパク質を含まない、生物学的語性のあるヒト組織因子重質タンパク質の水溶液を含有する組成物を含むパッケージ、

を含む血管システム液体サンプル中での凝固能を検定するキットの形をした鉢筋システム。

- (47)上記重領タンパク質がリン脂質中に分散している、諸求の題 頭(48)記載の砂断システム。
- (48)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1巻から 第219巻の部位で表わされるアミノ酸残器配列を有する、彼 求の範囲(46)記載の体質システム。
- (49)a) とト級機因子童領タンパク質をコードする構造遺伝子を定義する第1のDNA断片及び、第1のDNA断片と連続しており、かつ上記タンパク質に結合する、アミノ酸残差リーダー配列をコードする第2のDNA断片で、鎮第1及び第2のDNA断片合せて上記タンパク質の和駆体をコードする温度構造遺伝子を定しているDNA断片と機能的に結合する、ホ乳類細胞に適合する発現ベクターを含む組換えDNA分子でトランスホームしたホ乳質細胞の栄養培地での培養を開始する;
 - b)上記培養物を上記細胞が上記組換え DNA分子由来のタンパク質を発現し、かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する、そして
 - c)上記培養物から、上記成熟タンパク質を回収する、·
- 以上、a)~c) のステップを含む、成熟にト組織因子重復タンパク質の調製方法。

平成 7.12.20 発行

を含むサンブル中に存在するヒト組織因子重領タンパク質の存在を検定するための、キットの形をした診断システム。

- (40)上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体組成物が、
 - *) TF8-5G9.
 - b) TF9-6B4.
 - c) TF9-10H10

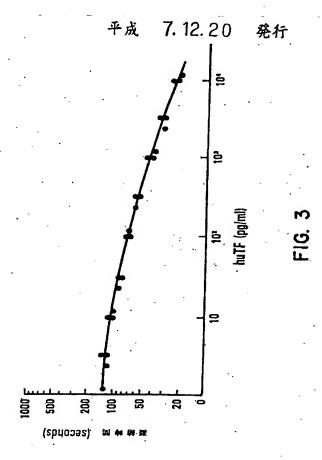
からなる舞から選ばれたハイブリドーマにより産生される、精 求の範囲(39)記載の参野システム。

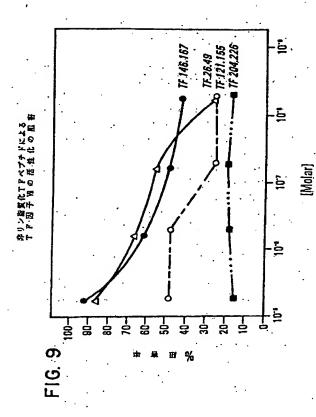
- (41) a) サンプルを、固体マトリックスに固定した、精欢の範囲 (15) 記載のポリペプチドを含む固体サポートと混合し、結 合反応混合物とする。
 - b)上記結合反応混合物を、上記設宜因子が上記がリペプチ ドと結合し、固相複合体及び上簿を形成するのに十分な時 間維持する。
 - c)上記複合体から上記上清を分離する、及び
 - d) ステップ c) の分離した複合体から、上紀森血因子を回収する、

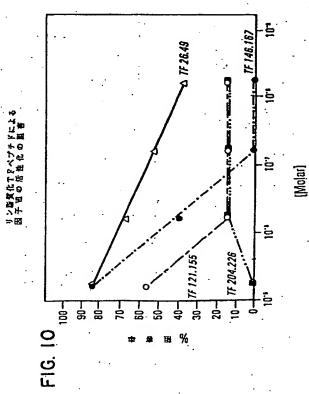
以上、a)~d)のステップを含む、サンプルから血液凝固因子VI/VI a を単離する方法。

- (42)実質的に、ヒト組織因子軽額タンパク質を含まない生理学的 悟性のあるヒト組織因子重額タンパク質の水溶液を含む組成物。
- (43)上記生物学的活性のあるヒト組織因子重領タンパク質を、リン脂質中に分散させた、建议の範囲(42)記載の組成物。
- (44)上記締被が、非イオン性界面活性剤を含む、積求の範囲(42) 記載の銀成物。
- (45)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1番から 第219者の部位で表わされるアミノ酸残器配列を有する、請
- (50)上記混成構造遺伝子が、第2図の第34番から第786巻の 塩基で表わされるスクレオチド塩蒸配列を有する、請求の範囲 (44)記数の方法。
- (51) 請求の範囲(49)記載の方法により産生した、成熟ヒト組織因子宣旗タンパク質を基本的に合む組成物。
- (52) 請求の範囲(SD) 記載の方法により産生した成熟ヒト組織因子 重領タンパク質を基本的に含む組成物。
- (53) バイブリドーマTF8 5 G9 により産生される抗体分子を、 投与時間内に存在するヒト組織因子と効率よく結合できる量金 有する、生理学的に許容された希釈和を含む、モノクローナル 抗体組成物を、被技者に静原投与することを含む、ヒト組織因 子の、組血開始能を中和する方法。
- (54) ヒト級機関子重数タンパク質及び、第1回の第25者から第49者の残害で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する液体分子を度生する、TF9-5B7と命名されたハイブリドーマ。
- (55) 請求の範囲(54) 記載のハイブリドーマにより歴生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (56) ハイブリドーマTP9-5BTにより産生される抗体分子を 合有する生理学的に許容された希沢利を含む治療に効果的な量 のモノクローナル抗体組成物を、被検者に投与することを含む、 ヒト組織因子の凝血開始能を中和する方法。
- (S7)a) ヒト組織因子重領タンパク質と免疫反応し、それにより、 領タンパク質の因子別ノリュへの結合能を図客し、かつ
 - b) h u T F h : W / W a 複合体と免疫反応し、それにより、 紡複合体の因子 X 活性化能を阻容する抗体分子を含む治療 的に効果的量の、抗凝血モノクローナル抗体組成物を投与

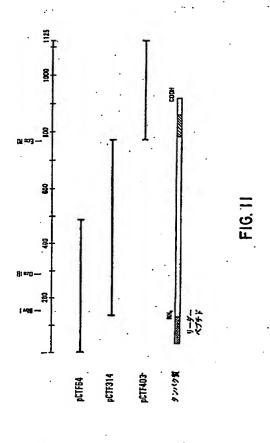
することを含む製血を粗容する方法。 (58)上記試体分子がさらに、ヒヒ組織因子と免疫反応を起こすことを特徴とする、請求の顧照(57)記載の方法。

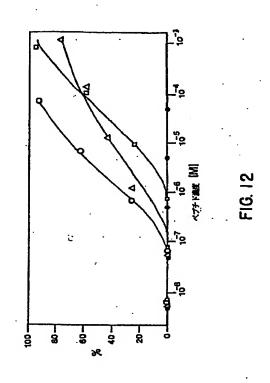


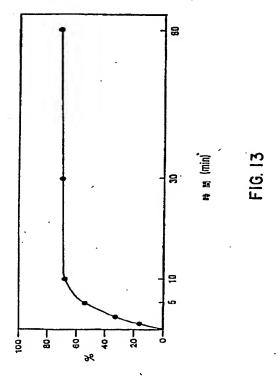


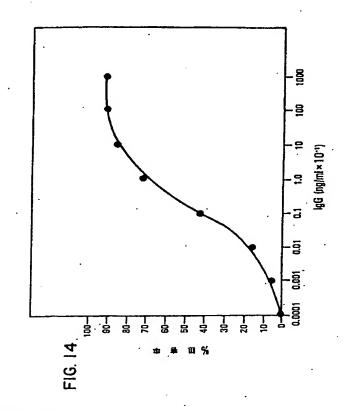


-.568--40-









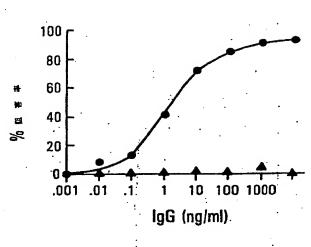
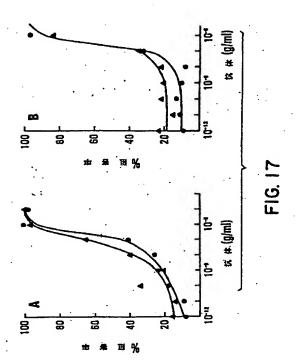


FIG. 16



THIS PAGE BLANK (USPTO)